

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

QP
501
J67

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoken; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIV

TOKYO

1932

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIVOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XIV

TOKYO

1931-1932

COPYRIGHT 1932

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS OF VOLUME XIV.

No. 1, September, 1931

	Page
TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in the heated serum. Part IV. The cold, non-complementary hemolysis by the heated serum of cold-blooded animals	1
TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in the heated serum. Part V. The cold, non-complementary hemolysis by the heated body-fluids	9
KURATA, Kurazi. Über die fermentative Spaltung der Diphenylpyrophosphorsäure	25
KIMURA, Tadao. Über den Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorstoffwechsel. I. Phosphorsäure im Blut bei Zufuhr von Cholsäure ...	51
TAKATA, Hiroshi. Über den Einfluss der Gallensäure auf Glycerophosphatase	61
OKUYAMA, Daisaburo. The redox-potential of the living tissue	69
KOJIMA, Shunsuke. Studies on peroxidase. I. Potentiometric studies on peroxidase	79
KOJIMA, Shunsuke. Studies on peroxidase. II. The effect of peroxidase on the bactericidal action of phenols	95
SIBUYA, Sigetosi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweisstoffwechsel. I. Die stickstoffhaltigen Extrativstoffe der Krötenleber während der Sommerzeit	111
URAKI, Ziro. Bedeutung der Gallensäure im Kohlehydratstoffwechsel. XI. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der Hexosephosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel	123
TADOKORO, Tetsutaro, ABE, Makoto and YOSHIMURA, Katsuji. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins	145
HORIUCHI, Kiyoma. Über die Phytase und die Spezifität der Phosphoesterase	163

No. 2, November, 1931

MANAKA, Choichiro. Über die fermentative Hydrolyse der verschiedenen Phosphorsäureester und die spontane Hydrolyse der Phosphosalicylsäure	191
INOUE, Takeo. Über das Wesen der Pilocarpinhyperglykämie	215
HORIGUCHI, Shusuke. The determination of oxyproteic acid in urine	257
HORIGUCHI, Shusuke. Studies on the excretion of neutral sulphur and oxyproteic acid in urine under several different conditions	265

KODAJIMA, Shyokichi. Some studies on isolated liver cells. I. On the durability of the vitality of isolated liver cells and their enzymes	279
KODAJIMA, Shyokichi. Some studies on isolated liver cells. II. On the effect of dye-stuffs on the vitality of isolated liver cells and on the activity of hydrolases within the cells	291
YANAGI, Kintaro. Ein Beitrag zum Studium der Eigenschaften des Plasmaeiweisses vom Quergestreiften Muskel	305
SATO, Ryoji and OHATA, Shinsuke. Studies in experimental scurvy. XI. Glutathione content of organ tissues of guinea pigs fed on vitamin C free diet	325
OMORI, T. Über Schwermetallkatalyse von biologischem Interesse. I. Mitteilung. Der Stärkeabbau durch künstliche Peroxydase	331
OMORI, T. Über den Einfluss der Chlorionen auf die Speichelamylase	339
SUMINOKURA, Kunihiko. A colorimetric micro method for the determination of pentoses	343
RO, Kishun. Über die Urikase	361

No. 3, January, 1932

RO, Kishun. Über die quantitative Bestimmung des Allantains auf kolorimetrischem Wege	391
RO, Kishun. Über die Allantoinase	405
RO, Kishun. Über den Allantoingehalt des Harns von Neugeborenen und Schwangeren, und des Amnionswassers	413
SASO, Takeshi. The change in the amount of blood-chlorine during asphyxiation from the view-point of acidosis	419
TAKATA, Hiroshi. Über den Einfluss der Gallensäure auf Glycerophosphatase II	439
KUDO, Fumio. Biochemical studies on hydrocyanic Acid. VII. On the cause of hydrocyanic acid hyperglycemia	447
TANAKA, Keizo. Beiträge zur Kenntnis der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure	463
MASAMUNE, H. and KODAMA, K. A micromethod for the determination of peroxidase	475
MANAKA, Choichiro. Über phosphosalicylaldehyd und oxydative De-phosphorierung	481
MIKAMI, Hisashi. Studien über Gallensäurenstoffwechsel. IV. Über den Einfluss der Bakterien und der Ultraviolet- und Röntgenstrahlen auf Gallensäuren	489

A COLD-HEMOTOXIN, NEWLY DISCOVERED IN THE HEATED SERUM.

Part IV.

The Cold, Non-Complementary Hemolys caused by the Heated Serum of Cold-Blooded Animals.

By

KATSUO TOSHIMA.

*(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University,
Sapporo, Japan. Director: Prof. K. Yamakami.)*

(Received for publication, March 16, 1931)

INTRODUCTION.

In the previous reports (1931, i, ii, iii), I have described the cold-hemolysis which we have discovered in the heated serum of various warm-blooded animals. The substance causing this hemolysis seems to belong to a protein of albumin character. It exists in fresh serum in an inactive state, and is activated by heating the serum at 70–100°C for 30 minutes. It reacts upon the erythrocytes only at temperatures below 5°C. But the erythrocytes can combine with it even at 37°C when it is in the active state, that is, in the heated serum, while the erythrocytes do not combine with it even 0°C in its inactive state or in the unheated serum.

In the present paper, I am going to describe the results of experiments made with the serum of cold-blooded animals.

There are numerous investigations on the hemolytic action of serum of cold-blooded animals. Friedberger and Seelig (1908) reported that the hemolytic substance of frog serum is a kind of hemotoxin which cannot be separated into its components. Camus and Gley (1899) and Sato (1917), studying the serum of eel, and Nagaoka (1921) studying the serum of catfish, found that the hemolytic action of these sera is caused by a sort of hemotoxin

or that the hemolytic substance can not be separated into amboceptor and complement.

On the contrary, Noguchi (1903), Lazar (1904) and Liefmann (1911) proved that the hemolysin of frog serum has a complex structure and can be separated into amboceptor and complement. Amako (1912), analysing the serum of tortoise and toad, asserted that the hemolysins of these animals are both constructed from amboceptor and complement and its complement can be separated into "mid-piece" and "end-piece". Nozawa (1923) obtained the same results as regards the sera of tortoise, snake, frog, toad and carp.

According to Liefmann and Andreew (1911), the hemolysin of eel serum can also be separated into two parts by means of the method precipitating globulin.

It is generally proved that the hemolytic substances of sera of cold-blooded animals have a remarkably weaker resistance against heating compared with those of warm-blooded animals and that both the amboceptor and complement are entirely destroyed by heating at temperatures below 60°C.

In order to know whether the serum of cold-blooded animals causes the cold-hemolysis as in the case of warm-blooded animals, I have carried out some experiments employing the sera of various cold-blooded animals.

MATERIALS AND METHODS.

The sera of turtle (Reptilia), frog (Amphibia), eel and carp (Fishes) were employed as experimental materials.

For obtaining the serum of turtle, eel and carp, the blood which flows out on cutting off the neck was taken into sterilized test-tubes and the serum was separated by means of a centrifuge. For obtaining the serum of frog, the animal was fixed on the back on a board and the blood was taken by cutting off the aorta and then the serum was separated as before.

The erythrocytes employed for these experiments were those

of various warm-blooded and cold-blooded animals such as man, cattle, horse, pig, rabbit, guinea-pig, chicken, goose, duck, turtle, frog, eel and carp.

These erythrocytes were always freshly taken, employing a small quantity of 10% sodium citrate solution as anti-coagulant, washed 4 times and made to suspension of 2.5% with the physiological salt solution.

The experiments were carried out in the same way as with the serum of warm-blooded animals; that is, the sera of cold-blooded animals were diluted to $\frac{1}{5}$ with the physiological salt solution and heated at 70°, 80°, 90° and 100°C for 30 minutes and one drop of 2.5% emulsion of various erythrocytes were added to 0.25 cc. of the heated serum. The cold-hemolysis was examined at 0°C after 6 hours. Control tests were of course made strictly.

EXPERIMENTS.

I. Experiments with the serum of reptilia.

As reptilia, turtle was chosen.

The fresh normal serum has hemolytic power for various sorts of erythrocytes. According to our investigation, the degree of hemolysis by turtle-serum differs with the species of erythrocytes, and can be ranged as follows: rabbit > horse > cattle > pig > duck > guinea-pig > man. The erythrocytes of chicken, goose, turtle, frog and carp are not hemolysed by the serum of turtle.

For the purpose of our experiments, the serum of turtle was diluted to $\frac{1}{5}$, heated for 30 minutes at 70–100°C, and its cold-hemolytic power was tested.

The results were all negative, as are given in table I.

The cold-hemolysis occurred in no cases of the kinds of erythrocytes employed.

II. Experiments with the serum of amphibia.

As amphibia the frog was chosen.

TABLE I.
Experiment with the serum of turtle.

Species of animals	Kinds of erythrocytes	Heating temperature (C)				Control (NaCl)
		70°	80°	90°	100°	
Mammalia	Man	—	—	—	—	—
	Cattle	—	—	—	—	—
	Horse	—	—	—	—	—
	Pig	—	—	—	—	—
	Rabbit	—	—	—	—	—
	Guinea-pig	—	—	—	—	—
Birds	Chicken	—	—	—	—	—
	Goose	—	—	—	—	—
	Duck	—	—	—	—	—
Reptilia	Turtle	—	—	—	—	—
Amphibia	Frog	—	—	—	—	—
Fishes	Eel	—	—	—	—	—
	Carp	—	—	—	—	—

The fresh normal serum of frog has also hemolytic power for various sorts of erythrocytes. According to Nozawa, the degree of hemolysis can be ranged as follows: rabbit > snake > carp > man > chicken > guinea-pig > pigeon > tortoise > cattle > goat > white rat. The erythrocytes of toads are not destroyed by the serum of frog.

Our experiments with the serum of frog were carried out in the same way as in the previous experiment.

The results are given in table II.

It has been demonstrated by this experiment that the frog serum evidently causes the cold-hemolysis for the erythrocytes of horse, pig and chicken, but not for other sorts of erythrocytes. The hemolytic power is the strongest for horse erythrocytes, and, for the heating temperature, 90° and 100°C are the most effective.

The control test as to the reacting temperature was made in the following way.

TABLE II.
Experiment with the serum of frog.

Species of animals	Kinds of erythrocytes	Heating temperature (C)				Control (NaCl)
		70°	80°	90°	100°	
Mammalia	Man	—	—	—	—	—
	Cattle	—	—	—	—	—
	Horse	+	+	+	+	—
	Pig	±	+	+	+	—
	Rabbit	—	—	—	—	—
	Guinea-pig	—	—	—	—	—
Birds	Chicken	—	+	+	+	—
	Goose	—	—	—	—	—
	Duck	—	—	—	—	—
Reptilia	Turtle	—	—	—	—	—
Amphibia	Frog	—	—	—	—	—
Fishes	Eel	—	—	—	—	—
	Carp	—	—	—	—	—

The serum of frog was diluted to $\frac{1}{5}$ with the physiological salt solution and heated at 90°C for 30 minutes. To each 0.25 cc. of the heated serum, one drop of 2.5% erythrocytes-emulsion of horse, pig, chicken, etc. were added and were placed at 37°, 20°, 5° and 0°C for 6 hours.

Table III shows the results.

As is shown in the given table, the hemolysis occurred only at 0°C.

Thus we see that frog serum contains the same substance causing the cold-hemolysis as the serum of warm-blooded animals.

TABLE III.
Experiment on the reacting temperature of heated frog serum.

Kinds of erythrocytes employed	Reacting temperature (C)				Control (NaCl)
	37°	20°	5°	0°	
Horse	—	—	—	+	—
Pig	—	—	—	+	—
Chicken	—	—	—	+	—
Control (fresh unheated from serum)	+++	+++	+	±	—

III. EXPERIMENTS WITH THE SERUM OF FISHES.

1. *Serum of eel.*

Mosso has already shown that the native serum of eel has the hemolytic action for various erythrocytes. According to Sato, the hemolytic action of eel serum is the strongest for the erythrocytes of rabbit and weaker for those of dog, cattle, rat and pig, the weakest for those of man, guinea-pig, goat, white rat, cat and horse. Those of birds and cold-blooded animals are not hemolysed by eel serum.

I have carried out the experiment upon the cold-hemolysis in the same way as before.

The results were always negative. No kinds of erythrocytes were hemolysed by the heated eel serum at 0°C.

2. *Serum of carp.*

The native serum of carp has also the hemolytic action for various kinds of erythrocytes. According to Nozawa, the degrees of hemolysis by the fresh carp serum differ with the species of erythrocytes and can be ranged as follows: rabbit > frog > pigeon > snake > guinea-pig > goat > white rat > man. And the erythrocytes of cattle, chicken, tortoise and toad are not hemolysed by the fresh carp serum.

I have performed the experiments with the heated carp serum upon the cold-hemolysis in the same manner as before, but always with negative results.

CONCLUSIONS.

Among the sera of various cold-blooded animals, only that of frog has been proved to contain the substance causing the cold-hemolysis, when the serum is heated at suitable temperatures.

The power of cold-hemotoxin in the heated frog serum is the strongest for the erythrocytes of horse, and weaker for those of pig and chicken.

And various other sorts of erythrocytes are not hemolysed by it.

REFERENCES.

- Amako (1912): Saikingaku Zasshi, No. 206.
Camus and Gley (1899): Ann. de l Institut Pasteur., **13**, 779.
Friedberger and Seelig (1908): Centralbl. f. Bakt., I. Abt. Orig., **46**, 421.
Lazar (1904): Wien. klin. Woch., Nr. 40, 1057.
Liefmann (1911): Berl. klin. Woch., Nr. 37, 1682.
Liefmann and Andreew (1911): Zeitschr. f. Immunitätsforsch., **11**, 707.
Mosso: Arch. z. exp. Pathol., **25**, 111.
Nagaoka (1921): Nippon Biseibutsugakkai Zasshi, **14**, 39.
Noguchi (1903): Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenkunde, **34**, 283.
Nozawa (1923): Nippon Biseibutsugakkai Zasshi, **17**, 311, 511.
Sato (1917): Nippon Biseibutsugakkai Zasshi, **5**, 263.
Toshima (1931, i): The Journal of Biochemistry, **13**, 291.
Toshima (1931, ii): The Journal of Biochemistry, **13**, 441.
Toshima (1931, iii): The Journal of Biochemistry, **13**, 489.

A COLD-HEMOTOXIN, NEWLY DISCOVERED IN THE HEATED SERUM.

Part V.

The Cold, Non-Complementary Hemolysis by the Heated Body-Fluids.

BY

KATSUO TOSHIMA.

*(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University,
Sapporo, Japan. Director: Prof. K. Yamakami.)*

(Received for publication, March 16, 1931)

INTRODUCTION.

I have reported in the previous papers (1931, i, ii, iii, iv), the results of experiments in which I have determined the fact that the sera of various warm-blooded animals manifest a peculiar sort of cold-hemolysis when they are heated at suitable temperatures. Among the sera of cold-blooded animals, only that of the frog has been proved to possess the same property.

Now, it is well known that various immune bodies exist not only in the serum but also in various body-fluids.

Consequently, it is very reasonable to presume that the cold-hemolytic substance which we have discovered in the heated serum may exist also in various physiological and pathological fluids of the body.

The present paper deals with the results obtained with various body-fluids of man and rabbit.

MATERIALS AND METHODS.

As physiological fluids of body, milk (man), saliva (man and rabbit), aqueous humour of eye (rabbit), cerebrospinal fluid (rabbit), urine (man and rabbit) etc., and as pathological body-fluids, the pleural exudate (man and rabbit), peritoneal exudate

(man and rabbit), pericardial exudate (rabbit), fluid of ovarian cyst (man) and peritoneal transudate (man) etc. were examined.

As erythrocytes, those of chicken, man, horse and pig were used.

They were washed four times with the physiological saline solution and made to 5% emulsion.

The body-fluids were suitably diluted with the physiological saline solution in order to prevent the heat coagulation of protein. They were then heated at temperatures 70°, 80°, 90° and 100°C for 30 minutes and to 0.5 cc. of the heated fluids one drop of 5% emulsion of various erythrocytes was added and the mixture was placed at 0°C for 6 hours.

When the amount of material was too scanty, 0.25 cc. of heated fluids and one drop of 2.5% erythrocytes-emulsion were used.

For the purpose of determining whether the hemolysis obtained is really the cold-hemolysis or not, the body-fluid was heated at 90° or 100°C for 30 minutes and the mixture of heated fluid and erythrocytes was placed at 37°, 20°, 5° and 0°C for 6 hours.

Results of Experiments.

I. EXPERIMENTS WITH THE PHYSIOLOGICAL BODY-FLUIDS.

1. *Milk.*

As experimental materials, the human milk obtained from a healthy puerpera was employed. The milk was diluted to $\frac{1}{2}$ with the physiological saline solution and heated. And to 0.5 cc. of the heated milk one drop of 5% suspension of erythrocytes was added and placed at 0°C for 6 hours.

The results are shown in table I.

It will be seen in the table that (contrary to our expectation) human milk does not cause the cold-hemolysis.

2. *Saliva.*

The human saliva was obtained from a healthy man and that

TABLE I.
Experiment with human milk.

Sorts of erythrocytes	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
	70°	80°	90°	100°	
Chicken	—	—	—	—	—
Man	—	—	—	—	—
Horse	—	—	—	—	—
Pig	—	—	—	—	—

of rabbit by injection 1.0 cc. of 1% solution of pilocarpin into the ear vein.

Both of the saliva were diluted to $\frac{1}{2}$ and filtered. The experiments as to the cold-hemolysis were carried out in the same way as before.

TABLE II.
Experiment with saliva of man and rabbit.

Kinds of saliva	Erythrocytes	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
		70°	80°	90°	100°	
Man	Chicken	—	—	—	—	—
	Man	—	—	—	—	—
	Horse	≡	≡	≡	≡	—
	Pig	+	+	+	+	—
Rabbit	Chicken	—	—	—	—	—
	Man	—	—	—	—	—
	Horse	≡	≡	≡	≡	—
	Pig	±	±	±	±	—

As shown in table II, a remarkable hemolysis for the erythrocytes of horse and pig, but no hemolysis for the erythrocytes of chicken and man was caused by saliva. The human saliva

caused the strongest hemolysis for horse erythrocytes when heated at 70°C, and a little weaker when heated at 80° to 100°C. Pig erythrocytes were also hemolysed slightly by the heated human saliva. Similar results were also obtained with the saliva of rabbit. The erythrocytes of man and chicken were not hemolysed.

In the other experiments, both of the saliva, heated at 90°C for 30 minutes were added with horse erythrocytes and placed at 37°, 20°, 5° and 0°C for 6 hours.

The results are given in table III.

TABLE III.

Experiment upon the reacting temperature of cold-hemolysis
by the heated saliva.

Kind of saliva	Treatment of saliva	Reacting temperature (C)			
		37°	20°	5°	0°
Man	Heated	—	—	—	++
	Not heated	++	+	+	+
Rabbit	Heated	##	—	—	++
	Not heated	###	++	+	+

As will be noticed in the table, the heated human saliva causes hemolysis only at 0°C, indicating that the hemolysis obtained is doubtlessly the same sort of hemolysis as in the case of heated serum.

But in the heated saliva of rabbit, hemolysis occurred not only at 0°C but also at 37°C, while at 20° and 5°C no hemolysis took place.

This hemolysis which occurred at 0°C may probably be due to the cold-hemotoxin in the heated saliva of rabbit. But we can not explain at present the nature of that hemolysis which has been caused by the heated rabbit saliva at 37°C.

3. *Aquaeus humour of eye.*

As equaeus humour of eye, that of healthy rabbits was employed.

I could obtain on an average 0.5 cc. of humour aquaeus from one rabbit by means of a small hypodermic needle.

The undiluted humour aquaeus was heated at 90°C for 30 minutes, and to 0.25 cc. of th heated humour one drop of 2.5% emulsion of various erythrocytes was mixed and the mixture was placed at 37°, 5° and 0°C for 6 hours.

The results are shown in table IV.

TABLE IV.
Experiment with the aquaeus humour of rabbit.

Erythrocytes	Reacting temperature (C)			Contrast (NaCl)
	37°	5°	0°	
Chicken	—	—	—	—
Man	+	—	—	—
Horse	卅	—	卅	—
Pig	—	—	—	—
Contrast (unheated humour aquaeus for horse erythrocytes)	卅	卅	卅	—

As will be seen in the table, the unheated humour aquaeus of rabbits has a strong hemolytic power for the erythrocytes of horse, and even after heating it at 90°C, the hemolytic power still remains for the erythrocytes of horse and man and the cold-hemolysis is positive only for horse erythrocytes.

4. *Cerebrospinal fluid.*

The cerebrospinal fluid was taken from healthy rabbits by Yamaoka's technique (1923). It was colourless, transparent and the quantity obtained from one rabbit was about 1.0 cc.

The experiment of cold-hemolysis was carried out in a similar way as in the case of aqueous humour of eye.

The results are given in table V.

TABLE V.
Experiment with cerebrospinal fluid.

Erythrocytes	Reacting temperature (C)			Contrast (NaCl)
	37°	5°	0°	
Chicken	—	—	—	—
Man	+	—	—	—
Horse	冊	—	冊	—
Pig	—	—	—	—

The cold-hemolysis was positive only for the horse erythrocytes as is indicated in the table.

5. *Urine.*

The urine of a healthy man and that of rabbit obtained by means of a catheter were employed as experimental materials.

The urine was first filtered and then dialized in the running water for a day in order to eliminate the salts, and then made isotonic by adding NaCl, making its volume twice the original.

The urine thus treated was heated at 70–100°C for 30 minutes, and to 0.5 cc. of the heated urine one drop of 5% erythrocytes-emulsion was added, and placed at 0°C for 6 hours.

The results of this experiment were always negative. In no cases, was the cold-hemolysis observed.

II. EXPERIMENTS WITH THE PATHOLOGICAL BODY-FIELDS.

As experimental materials, the pleural-, the peritoneal- and the pericardial exudate, the fluid of ovarian cyst and the peritoneal transudate were employed.

1. *Pleural exudate.*

a. Pleural exudate of man.

For this experiment the clear exudate was chosen, which contained about 5% albumin. In order to prevent the heat coagulation of protein the exudate was diluted to $\frac{1}{5}$ when to be heated at 70°C, to $\frac{1}{8}$ when to be heated at 80°C and to $\frac{1}{10}$ for heating at 90–100°C. And the cold-hemolytic power of the heated exudate was tested.

The results were always negative.

The cold-hemolysis could not be demonstrated in any of the heated exudate.

b. Pleural exudate of rabbit.

The pleural exudate was obtained from rabbits in which pleurisy was produced experimentally.

The experimental-pleurisy of rabbit has been studied by numerous workers such as Heinz (1900), Coenen (1901), Schiff (1903), Brunn (1900), Mönekeberg (1903), Helly (1905), Kondo (1923) etc.. But the pleural exudate produced by the method of these workers contains various foreign bodies, chemical agents or bacteria, and consequently it is not suitable for our experiments.

I have therefore employed the method of Kanai and Minami (1923) for producing the experimental-pleurisy.

These authors have discovered the fact that the sudden change in the balance of ions in the body-fluids or the obstruction of the regular exchange of matter can give rise to a non-infectious, non-traumatic pleurisy. For instance, they could produce the experimental-pleurisy by injecting once daily 0.3 cc. of 0.1% adrenalin into the ear vein of rabbits for 5 to 8 days. Moreover, when the rabbit treated as above was injected with 5.0 cc. of the mixture of 2% calcium chloride and 10% solution of grape sugar, the change in the thoracic cavity became more remarkable and the

exudate became evidently hemorrhagic and was sometimes complicated with peritonitis.

I have carried out the experiment in the following way.

Rabbits weighing 2-3 kg were injected once daily with 0.3 cc. of 0.1% adrenalin into the ear vein and after the sixth to eighth injection, the rabbits were killed by bleeding and the exudate in thoracic-, peritoneal- and pericardial cavity was taken. Or the rabbits were injected once daily with 0.1% adrenalin and a mixture of 2% calcium chloride and 10% grape sugar into the ear vein.

Some examples are given below.

Rabbit No. 1 ♂ 2.6 kg

From 26/VIII to 3/IX; injected daily with 0.3 cc. of 0.1% adrenalin.

4/IX; killed by cutting off the carotis.

0.5 cc. exudate in the right-, 2.7 cc. in the left pleural cavity and 0.5 cc. in the abdominal cavity were obtained from this rabbit.

Rabbit No. 2 ♂ 2.3 kg

From 16/IX to 17/IX; 0.1% adrenalin 0.2 cc. } injected daily.
(CaCl₂ + C₆H₁₂O₆) 5.0 cc. }

18/IX to 21/IX; 0.1% adrenalin 0.3 cc. } injected daily.
(CaCl₂ + C₆H₁₂O₆) 5.0 cc. }

22/IX; killed by cutting off the carotis.

The amount of exudate was 4.0 cc. in the right pleural cavity, 0.8 cc. in the left pleural cavity, 10.5 cc. in the abdominal cavity and 1.0 cc. in the pericardial cavity.

Rabbit No. 3 ♀ 2.86 kg

From 16/IX to 17/IX; 0.1% adrenalin 0.2 cc. } injected daily.
(CaCl₂ + C₆H₁₂O₆) 5.0 cc. }

18/IX to 22/IX; 0.1% adrenalin 0.3 cc. } injected daily.
(CaCl₂ + C₆H₁₂O₆) 5.0 cc. }

23/IX; killed by bleeding as before.

The amount of exudate obtained was 2.5 cc. in the right pleural cavity, 2.0 cc. in the left pleural cavity, 39.8 cc. in the abdominal cavity and 2.0 cc. in the pericardial cavity.

Various exudates thus obtained were not bloody and contained a large quantity of fibrin. The albumin content of pleural exudate

was 3% in the case of rabbit No. 2 and 2% (right) or 2.5% (left) in the case of rabbit No. 3.

These exudates were diluted to $\frac{1}{5}$ with the physiological salt solution and heated at temperatures 70° to 100°C for 30 minutes. To 0.25 cc. of the heated exudate, one drop of 2.5% suspension of various erythrocytes was added and the mixture was placed at 0°C for 6 hours.

The results are shown in table VI.

TABLE VI.
Experiment with the pleural exudates of rabbits.

Number of. rabbits	Side of pleural cavity	Erythrocyt.	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
			70°	80°	90°	100°	
No. 2	Right	Chicken	—	—	—	+	—
		Man	—	—	—	—	—
		Horse	—	±	+	+	—
		Pig	—	—	—	±	—
	Left	Chicken		—	±		—
		Man		—	—		—
		Horse		±	+		—
		Pig		—	—		—
No. 3	Right	Chicken	—	+	+	+	—
		Man	—	—	±	+	—
		Horse	—	±	±	+	—
		Pig	—	±	+	+	—
	Left	Chicken	±	+	+	+	—
		Man	—	—	±	±	—
		Horse	—	±	±	+	—
		Pig	—	±	+	+	—

In the case of rabbit No. 2, the right pleural exudate showed positive results for the erythrocytes of chicken, horse and pig, and

negative for the human erythrocytes; the left pleural exudate caused a weak hemolysis or only a trace of hemolysis for the erythrocytes of horse and chicken.

In the case of rabbit No. 3, both the right and left pleural exudates showed positive results for all sorts of erythrocytes.

The hemolysis here observed is doubtlessly the cold-hemolysis, because the control experiment has demonstrated that the hemolysis takes place only at 0°C, as is indicated in table VII.

TABLE VII.
Experiment upon the reacting temperature of the heated pleural exudates for horse erythrocytes.

Number of rabbits	Side of pleural cavity	Treatment of exudate	Reacting temperature (C)			
			37°	20°	5°	0°
No. 2	Right	Heated	—	—	—	+
		Not heated	冊	冊	冊	冊
No. 3	Right	Heated	—	—	—	+
		Not heated	冊	冊	冊	冊
	Left	Heated	—	—	—	+
		Not heated	冊	冊	冊	冊

2. *Peritoneal exudate.*

a. Peritoneal exudate of man.

The human peritoneal exudate was obtained from patients of peritonitis. The albumin content of this exudate was 4%.

It was diluted to $\frac{1}{5}$ and experimented with as before.

As shown in table VIII, the hemolysis was only a trace or weak positive for the erythrocytes of chicken, horse and pig and negative for human erythrocytes.

b. Peritoneal exudate of rabbit.

The peritoneal exudate of rabbits was obtained from the rabbits

in which the experimental-pleurisy had been produced. It contained 4.5% albumin.

It was also diluted to $\frac{1}{5}$ and its cold-hemolytic power was tested as before.

TABLE VIII.

Experiment with the heated peritoneal exudate of man and rabbit.

Sort of exudate		Sort of erythrocyt.	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
			70°	80°	90°	100°	
Man		Chicken	—	+	±	±	—
		Man	—	—	—	—	—
		Horse	—	+	+	+	—
		Pig	—	—	±	+	—
Rabbit	No. 2	Chicken	+	+	+	+	—
		Man	—	—	±	+	—
		Horse	±	+	+	+	—
		Pig	±	+	+	+	—
	No. 3	Chicken	+	+	+	+	—
		Man	±	±	+	+	—
		Horse	±	+	+	+	—
		Pig	±	+	+	+	—

As table VIII shows, the peritoneal exudate of rabbit showed positive results for all sorts of erythrocytes. The hemolysis was pretty strong compared with that caused by the human peritoneal exudate.

The results of control experiment proved that the hemolysis observed here was really the cold-hemolysis as given in table IX.

It is very interesting that the degree of hemolysis caused by the heated exudate differs with the sorts of erythrocytes, and can be ranged just in the same order as in the case of heated serum, that is, chicken > pig > horse > man.

TABLE IX.

Experiment upon the reacting temperature of the heated peritoneal exudate for horse erythrocytes.

Kinds of exudate	Treatment of the exudate	Heating temperature (C)			
		37°	20°	5°	0°
Man	Heated	—	—	—	—
	Not heated	卅	卅	卅	卅
Rabbit (No. 2)	Heated	—	—	—	+
	Not heated	卅	卅	卅	卅

3. Pericardial exudate.

For this experiment, the pericardial exudate obtained from rabbit No. 3 (experimental-pleurisy) was employed. The albumin content of this exudate was 1.6%.

It was diluted to $\frac{1}{5}$ and its hemolytic power was tested as before.

As shown in table X, the pericardial exudate of rabbit caused a weak-cold-hemolysis for all sorts of erythrocytes.

TABLE X.

Experiment with the pericardial exudate of rabbit.

Kinds of erythrocytes	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
	70°	80°	90°	100°	
Chicken	—	±	+	±	—
Man	—	—	—	±	—
Horse	—	±	±	+	—
Pig	—	±	+	+	—

4. Fluid of ovarian cyst.

The fluid of ovarian cyst belongs to transudates and contains

a large quantity of mucin, but its albumin content is usually about 1.2%.

In the present experiment, the fluid of ovarian cyst was diluted to $\frac{1}{5}$ and its cold-hemolytic power was tested as before.

The results were all negative.

The cold-hemolysis could not be demonstrated in the fluid of ovarian cyst, at least in the dilution of $\frac{1}{5}$.

5. Peritoneal transudate.

The material was taken from a patient of liver-cirrhosis.

Its albumin content was only 0.8%.

It was diluted to $\frac{1}{5}$ and the experiment of cold-hemolysis was carried out as before. The hemolysis was trace positive in the peritoneal transudate heated at 90° and 100°C only, for horse erythrocytes.

TABLE XI.
Experiment with the peritoneal transudate.

Sorts of erythrocytes	Heating temperature (C)				Contrast (NaCl)
	70°	80°	50°	100°	
Chicken	—	—	±	±	—
Man	—	—	—	—	—
Horse	±	±	±	±	—
Pig	—	—	—	—	—

TABLE XII.
Experiment upon the reacting temperature of the heated peritoneal transudate for horse erythrocytes.

Treatment of the fluid	Reacting temperature (C)			
	37°	20°	5°	0°
Heated	—	—	—	±
Not heated	±	+	—	—

When the same material was diluted to $\frac{1}{2}$, and the same experiment was made, the cold-hemolysis was fairly strong for horse erythrocytes and a trace for chicken erythrocytes, but negative for the erythrocytes of man and pig and the reacting temperature of hemolysis was only 0°C , as shown in table XI and XII.

CONCLUSIONS.

1. The human milk does not contain the substance causing the cold-hemolysis.
2. The saliva of man and rabbit contains the cold-hemolytic substance for the erythrocytes of horse and pig.
3. The aqueous humour of eye and the cerebrospinal fluid of rabbit causes the cold-hemolysis only for horse erythrocytes when heated suitably.
4. The urine of man and rabbit contains no cold-hemolytic substance.
5. The existence of the cold-hemolytic substance in the pleural exudate of man can not be proved.
6. The heated pleural exudate of rabbit causes a strong cold-hemolysis for various sorts of erythrocytes. The hemolysis is the strongest for chicken erythrocytes, gradually weak in order of the erythrocytes of pig, horse and man.
7. The heated peritoneal exudate of man causes the cold-hemolysis for the erythrocytes of chicken, horse and pig.
8. The heated peritoneal exudate of rabbit causes also a strong cold-hemolysis for various sorts of erythrocytes.
9. The heated pericardial exudate of rabbit causes a weak cold-hemolysis for all sorts of erythrocytes.
10. The fluid of human ovarial cyst contains no cold-hemolytic substance.
11. The heated peritoneal transudate of man causes the cold-hemolysis for the erythrocytes of horse and chicken.

I wish to express my indebtedness to Prof. K. Yamakami for his kind direction and encouragement during my experiments.

REFERENCES.

- Brunn (1900): Centralbl. f. allgem. Pathol. u. pathol. Anatomie, **11**, 604.
Coenen (1901): Virchow's Archiv., **163**, 84 .
Heinz (1900): Virchow's Archiv., **160**, 365.
Helly (1905): Ziegler's Beiträge, **37**, 171.
Kanai and Minami (1923): Ikai Jiho, No. 1764–1767.
Kondo (1923): Nippon Biseibutsugakkai Zasshi, **17**, 191.
Mönckeberg (1903): Ziegler's Beiträge, **34**, 489.
Schiff (1903): Centralbl. f. allgem. Pathol. u. pathol. Anatomie, **14**, 833.
Toshima (1931,i): The Journal of Biochemistry, **13**, 291.
Toshima (1931,ii): The Journal of Biochemistry, **13**, 441.
Toshima (1931,iii): The Journal of Biochemistry, **13**, 489.
Toshima (1931,iv): The Journal of Biochemistry, **14**, 1.
Yamaoka (1923): Kyoto Igakkai Zasshi, **12**, No. 3.

ÜBER DIE FERMENTATIVE SPALTUNG DER DIPHENYLPYROPHOSPHORSÄURE.

VON

KURAZI KURATA.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 21. März 1931)

Über die fermentative Hydrolyse der Phosphorsäureester wurden schon viele wertvolle Arbeiten herausgegeben und zwar vor allem aus dem Neuberg Institut in Dahlem. Von der grossen biochemischen Bedeutung des Phosphors bei verschiedenen Lebensvorgängen ausgehend, wurden auch in hiesigem Institut Studien über Phosphatase unter Leitung von Prof. Akamatsu unternommen, und einige neue Ergebnisse über die physikalisch-chemische Natur dieses Ferments und seinen Wirkungsmechanismus wurden von Kobayashi, Inouye und Asakawa mitgeteilt.

Asakawa (1929) hat bei Versuchen mit verschiedenen synthetischen Phosphorsäureestern einen recht interessanten Zusammenhang der Phosphatasenwirkung mit der chemischen Konstitution der Alkoholreste beobachtet.

Die Fermentlehre zeigt, dass manchmal eine Verbindung, die durch ein spezifisches Ferment hydrolysierbar ist, durch Bindung mit einer anderen Substanz eine Veränderung hinsichtlich ihres Verhaltens zu dem Ferment erleidet, die eventuell so weit geht, dass die Hydrolyse der neuen Verbindung durch ein ganz anderes Ferment ermöglicht wird.

Von der allgemeinen Hydrolysierbarkeit der Monophosphorsäureester, d.h. der Verbindungen aus je einem Molekül Phosphorsäure und Alkohol, ausgehend, wollten wir unsere Versuche zur Prüfung der noch komplizierteren Phosphorsäurederivate erweitern.

Die Bindung des Monophosphorsäureesters mit einer anderen Substanz kann entweder an dem Alkoholrest oder an dem Phosphorsäurerest stattfinden.

Bei der ersten Möglichkeit ist vor allem, falls der Alkoholrest zu den mehrwertigen OH-Verbindungen gehört, die Verkettung des zweiten Phosphorsäuremoleküls zu erwähnen.

Der von Kobayashi (1929) mit Diphosphoglycerinsäure angestellte Versuch ergab aber, dass in solchem Fall die Anzahl der gebundenen Phosphorsäuremoleküle keinen Einfluss auf das Verhalten zu Phosphatase ausübt, und dass jeder Phosphorsäurerest ganz unabhängig von anderen, aber, von der Natur der veresterten OH-Gruppe bedingt, nach derselben Regel abgespaltet wird, die bei der Hydrolyse der Monophosphorsäureester beobachtet wurde.

Unter demselben Prinzip steht auch der Abbau des Resorcin-diphosphorsäureesters, der von Manaka untersucht wurde, und über den in kurzem eine Mitteilung erfolgen wird. Selbst Phytin, Hexaphosphorsäureester des Inosits, macht keine Ausnahme, wie von Horiuchi ebenfalls bald mitgeteilt werden wird.

Bezüglich der oben erwähnten ersten Möglichkeit sollte noch die Bindung des Alkoholrests mit Substanzen von ganz anderer Art als die Phosphorsäure erwähnt werden.

Da aber solche Verbindungen mehr zum Versuch mit anderen Fermenten als Phosphatase dienen, werden sie hier absichtlich nicht eingehend erwogen.

Was die zweite Möglichkeit, d.h. die Bindung des Phosphorsäurerests mit einer anderen Substanz betrifft, so kommen wieder zwei Fälle vor:

Erstens der Fall wie beim Mono-orthophosphorsäurediester, z. B. Diäthylphosphorsäure. Eine solche Verbindung zeigte, wie Asakawa bei Untersuchung der Phosphatasenkinetik beobachtete, ein sonderbares Verhalten und erwartet weitere Erforschung.

Die zweite Art ist die Verkettung des Phosphorsäurerests mit einem anderen Molekül Phosphorsäure und zwar in Form von Pyrophosphorsäure. Fermentstudien mit solcher Verbindung

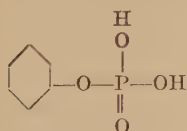
haben ein besonders grosses Interesse, da hier ausser der esterartigen Bindung eine Anhydrierung der Phosphorsäuren vorliegt. Als Substrat wurde Diphenylpyrophosphorsäure ausgewählt.

Der Diphenylester der Pyrophosphorsäure wurde zuerst von Neuberg und Wagner (1926) hergestellt, die erwiesen, dass dieser Ester der enzymatischen Zerlegung zugänglich ist, unter Bildung von Phenol und Orthophosphorsäure als Spaltprodukten.

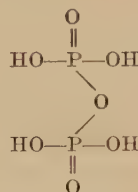
Was mich zum fermentativen Versuch mit diesem Ester veranlasste, ist die eigentümliche Struktur dieser Verbindung.

Man kann sie entweder als einen Phenylester der Pyrophosphorsäure oder als ein Anhydrid aus zwei Molekülen Phenylphosphorsäure annehmen. Phenylphosphorsäure gehört bekanntlich zu den leicht spaltbaren Phosphatasensubstraten. Die fermentative Hydrolysierbarkeit der Pyrophosphorsäure wurde andererseits von Lohmann (1928) und anderen festgestellt. Es bleibt aber noch dahingestellt, ob das Ferment, welches Phenylphosphorsäure spaltet, mit demjenigen, das anorganische Pyrophosphorsäure hydrolysiert, identisch ist.

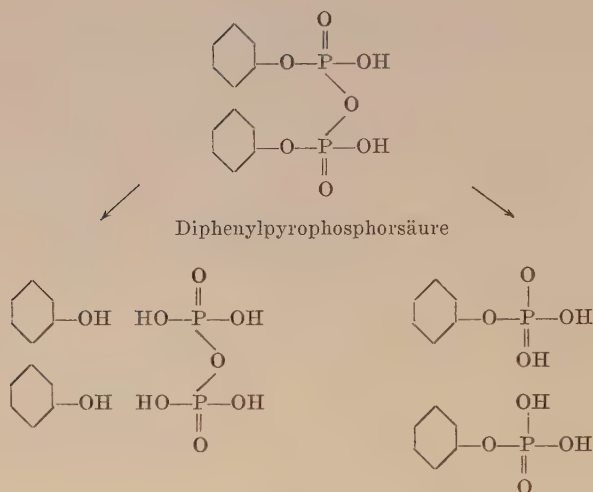
Diese Frage ist zuerst aufzuklären. Weiterhin kommt in Frage, ob bei der enzymatischen Zerlegung der Diphenylpyrophosphorsäure die Bindung zwischen Phenol und Pyrophosphorsäure zuerst angegriffen und anorganische Pyrophosphorsäure freigemacht wird, die dann in Orthophosphorsäure abgespalten werden kann, oder ob die primäre Hydrolyse an der Sauerstoffbrücke des Pyrophosphorsäureanteils stattfindet und sich daran die weitere Spaltung der entstandenen Phenylphosphorsäure anschliesst.



Phenylphosphorsäure



Pyrophosphorsäure



Um diese Fragen klar zu stellen, liess ich zuerst verschiedene Phosphatasenlösungen auf Phenylphosphorsäure, Pyrophosphorsäure und Diphenylpyrophosphorsäure einwirken und verglich die Ergebnisse untereinander.

Die gebrauchten Fermente waren Nieren-, Leber-, und Takaphosphatase, die nach in hiesigem Institut üblicher Methode hergestellt wurden, und ausserdem dialysierte Lösung von Kaninchenblut.

Asakawa (1928) hat bei seiner Untersuchung über Nierenphosphatase deren ausgeprägtes Optimum in alkalischer Reaktion beobachtet und hat, von der Form der Ph-Aktivitätskurve ausgehend, die tierische Phosphatase der pflanzlichen Phosphatase gegenübergestellt, die ausschliesslich in saurer Reaktion ihre Wirkung entfaltet. Die fortgesetzte Untersuchung in hiesigem Institut hat aber ergeben, dass in tierischen Geweben noch eine andere Phosphatase vorhanden ist, die wie die pflanzliche ihr Optimum in saurer Reaktion zeigt. Darüber wird demnächst Hori berichten. Da es sich aber bei der vorliegenden Mitteilung gerade um diese Arten tierischer Phosphatase handelt, und die Versuche mit den-

selben zur Lösung der oben aufgeworfenen Fragen geführt hatten, sei das Resultat von Hori hier flüchtig angegeben.

Durch die Nierenfermentlösung wurden die oben erwähnten drei Substrate ziemlich schnell hydrolysiert, sowohl bei Ph 3.5 als auch 8-9, dagegen fand sich im allgemeinen eine geringere Spaltung im Gebiet von Ph 6-7.

Bezüglich der optimalen Aciditäten prüfe man die im experimentellen Teil angegebenen Protokolle.

1928 hat Kay bei Phosphatasen von verschiedener Herkunft das Ph-Optimum der Pyrophosphatspaltung als Ph 7.2-7.8, gewöhnlich Ph 7.6, mitgeteilt. Die gebrauchte Pufferlösung war Palitzschsche Borax-Borsäure-Mischung. Aber als ich mit derselben Mischung (Ph 7.3-8.5) die Hydrolyse von Natriumpyrophosphat durch Nierenferment untersuchte, konnte ich binnen zwei Versuchsstunden keine Zunahme der Orthophosphorsäure nachweisen, während mit Glykokoll-Natron-Puffer bei Ph 8.1 eine lebhaft Hydrolyse konstatiert werden konnte.

Die Hemmung durch die Borax-Borsäure war ohne weiteres klar. Die hemmende Wirkung der Borsäure auf Phosphatase wurde schon von Erdtman (1927) angegeben. Jedoch war bei ihm, wie bei Kay, noch eine deutliche Hydrolyse nachweisbar. Die ausgeprägte Divergenz ihrer und meiner Resultate muss also durch die Darstellungsweise der Fermentlösungen verursacht worden sein.

Ein Vergleich der Gewinnungsverfahren der Fermentlösungen zeigte nun, dass bei ihnen die gebrauchten Fermentextrakte reicher an Eiweiss waren als bei uns, worauf ich die Versuche unter Zusatz einer 2 proz. Lösung von Eieralbumin ausführte und nun eine deutliche Hydrolyse nachweisen konnte.

Die Hemmung durch Borsäure war auch bei der Hydrolyse des Phenylphosphats und Diphenylpyrophosphats sehr stark und konnte gleichfalls durch Eiweisszusatz beträchtlich ermässigt werden.

Selbst bei anderen Pufferarten, wie Acetat-Essigsäure und Glykokoll-Natron, verursachte der Eiweisszusatz eine Beschleuni-

gung der Hydrolyse, obwohl in weit geringerem Masse als bei Borax-Borsäure. Die Borsäurehemmung berührt aber nicht den Kernpunkt der vorliegenden Mitteilung, sodass nunmehr die über die oben aufgestellten zwei Hauptfragen ausgeführten Experimente besprochen werden.

Um den Überblick zu erleichtern, gebe ich zunächst zusammenfassend die mit verschiedenen Fermentlösungen beobachtete Hydrolyse der drei Phosphorsäureverbindungen an, und zwar jeweils bei der optimalen Acidität der sauren Seite. Der prozentuelle Hydrolysegrad wurde aus der bemessenen anorganischen Orthophosphorsäure berechnet.

Substrat Herkunft der Fermentlösung	Phenyl- phosphor- säure	Pyro- phosphor- säure	Diphenyl- pyro- phosphor- säure	Anmerkung
Schweineniere	80%	63%	65%	nach 1 St. bei pH 3.5
Schweineleber	96%	20%	71%	nach 2 St. bei pH 3.5
Taka	38%	44%	0	nach 2 St. bei pH 2.9
Kaninchenblut	80%	0	0	nach 2 St. bei pH 5.2

Diese Ergebnisse zeigen erstens, dass die Fermentlösung, welche Phenylphosphorsäure aufspaltet, nicht immer Pyrophosphorsäure angreift, wie man aus dem Resultat mit Kaninchenblut ersehen kann.

Das Pyrophosphorsäure aufspaltende Ferment ist also spezifisch und soll „Pyrophosphatase“ genannt und vom Phosphorsäure-ester spaltenden gesondert, für das letztere aber die Benennung „Phosphoesterase“ vorgeschlagen werden.

Als die Fermentlösungen auf Diphenylpyrophosphorsäure einwirkten, stand die nach Folin (1915) kolorimetrisch gefundene Phenolmenge immer mit der gleichzeitig gemessenen Orthophosphorsäure in äquivalentem Verhältnis. Es kam kein freies Phenol

zur Beobachtung, ohne dass gleichzeitig die äquivalente Orthophosphorsäure bewiesen werden konnte.

Wenn man dazu noch in Erwägung zieht, dass die Taka-Lösung, trotz ihrem Reichtum an Phosphoesterase und Pyrophosphatase, Diphenylpyrophosphorsäure schwer angreift, kann man mit möglichster Wahrscheinlichkeit aussprechen, dass ein dritter Faktor für die Hydrolyse der Diphenylpyrophosphorsäure notwendig ist.

Wir sind nun in der Lage, die Richtigkeit des Schlusses, der aus den einzelnen Resultaten deduktiv gezogen wurde, experimentell zu prüfen.

Zuerst wurde die Isolierung der einzelnen Fermente unternommen und zwar durch die Adsorptionsmethode. Das Adsorptionsverfahren ist besonders wertvoll, um das Wesen der Fermente zu erforschen.

Die Adsorption findet jedoch im allgemeinen oft nicht selektiv statt und ist ausserdem nicht immer reversibel. Befriedigende Resultate sind überhaupt nur mit ausgewählten Adsorbentien und unter bestimmten Bedingungen zu bekommen. Dies war auch bei mir der Fall.

Die benutzten Adsorptionsmittel waren Kaolin, Tonerde C nach Willstätter (1923), kolloidale Magnesiumhydroxyd-Aufschwemmung (etwa 20%) nach Fuchs (1928), MgCO_3 (Merck), gelatinöses Ca-phosphat (etwa 30%), gelbes Eisenhydroxydgel nach Schikorr (1930), und ausserdem Tierkohle.

Behandelt man die Nierepfermentlösung in essigsaurer Reaktion mit Tonerde, so wirkt die Adsorptionsrestlösung hydrolytisch auf die drei genannten Substrate nur bei saurer Reaktion, aber nicht mehr in alkalischem Medium. Gelbes Eisenhydroxyd verhält sich wie Tonerde. Wenn dieselbe Fermentlösung bei acetat-alkalischer Reaktion mit Tonerde behandelt und das Adsorbat mit verdünnter Essigsäure eluiert wird, bekommt man ein Fermentgemisch, das wieder die drei Substrate ausschliesslich in saurer Reaktion angreift.

Wenn man dagegen die Nierenfermentlösung in acetat-alkali-

scher Reaktion mit MgCO_3 behandelt, so bemerkt man, dass die Adsorptionsrestlösung bei alkalischer Reaktion auf alle drei Substanzen, dagegen bei saurer Reaktion ausschliesslich und in schwachem Grad auf Pyrophosphorsäure aktiv ist.

Im grossen und ganzen kann man damit die beiden Fermentgemische, das eine das in saurer Reaktion und das andere das in alkalischer Reaktion wirkt, von einander trennen. Da dieses Ergebnis aber nicht viel mit den vorliegenden Hauptfragen zu tun hat, wollen wir, es nicht mehr berührend, weiter gehen.

Wenn die Nierenfermentlösung bei acetat-alkalischer Reaktion mit $\text{Mg}(\text{OH})_2$ behandelt wird, wirkt die erhaltene Adsorptionsrestlösung in saurem Medium ausschliesslich auf Pyrophosphorsäure.

Phosphoesteraselösung, die von Pyrophosphatase frei ist, wurde schon, wie erwähnt, bei Erythrocyten beobachtet. Solche Fermentlösung kann auch aus Leberlösung erhalten werden: Die Adsorptionsrestlösung, die beim Behandeln der betreffenden Organlösung mit Tonerde bei essigsaurer Reaktion erhalten wurde, enthält fast reine Phosphoesterase, die in saurem Medium wirksam ist.

Man besitzt damit die Phenylphosphatase und Pyrophosphatase in isoliertem Zustand.

Eine Fermentlösung, die ausschliesslich Diphenylpyrophosphorsäure aufspaltet, ist durchaus nicht zu erhalten. Aber wenn man die isolierte Leberphosphoesterase und Nierenpyrophosphatase zusammen auf Diphenylpyrophosphorsäure wirken lässt, entfaltet das Fermentgemisch eine deutliche Hydrolyse.

Die Leberphosphoesterase kann dabei durch Erythrocytenlösung ersetzt werden, die man hinsichtlich der Phosphatasen als reine Phosphoesterase annehmen darf. Dieses Resultat ist sehr auffallend; denn man weiss, dass das gereinigte Taka-Ferment Phenylphosphorsäure und Pyrophosphorsäure ziemlich stark, dagegen Diphenylpyrophosphorsäure äusserst schwer hydrolysiert.

Ehe wir diesen scheinbaren Widerspruch aufklären, gebe ich die folgenden Experimente an:

Man lässt zuerst Nierenpyrophosphatase auf Diphenylpyro-

phosphorsäure bei Ph 3.5 einwirken. Die Fermentwirkung wird dann durch Erhitzen unterbrochen. Weder Orthophosphorsäure noch Phenol ist dabei nachweisbar. Auf die abgekühlte Lösung lässt man dann die Leberphosphoesterase einwirken.

Nun ist eine bedeutende Menge Orthophosphorsäure nachzuweisen.

Wenn die Reihenfolge der beiden Arten von Fermenten umgekehrt wird, ist schliesslich weder freies Phenol, noch freie Orthophosphorsäure zu finden.

Diese Ergebnisse sind so zu deuten, dass Diphenylpyrophosphorsäure durch Nierenpyrophosphatase an der Sauerstoffbrücke des Pyrophosphorsäurerests aufgespalten wird, und daran anschliessend die Hydrolyse der entstandenen Phenylphosphorsäure durch Leberphosphoesterase erfolgt. Man steht jedoch wieder vor dem Widerspruch, der zwischen dem Verhalten des Taka-Ferments einerseits und dem des Gemisches aus Nierenpyrophosphatase und Leberphosphoesterase andererseits beobachtet wurde.

Um diesen Widerspruch aufzuklären, wurde als Annahme aufgestellt, dass für die Aufspaltung der Diphenylpyrophosphorsäure ein Aktivator notwendig ist, der dem gereinigten Taka-Ferment fehlt, wohl aber in Nierenpyrophosphatasenlösung vorhanden ist.

Diese Voraussetzung konnte experimentell verwirklicht werden.

Es wurde angenommen, dass der Aktivator dem gereinigten Taka-Ferment fehlt. Aber da das Ferment an sich genug Pyrophosphatase und Phosphoesterase enthält, sollte ein künstlicher, den Aktivator enthaltender Zusatz das Ferment völlig aktiv für die tiefgreifende Hydrolyse der Diphenylpyrophosphorsäure machen.

Unbehandelte Nieren- oder Leber-Fermentlösung greift, wie erwähnt, Diphenylpyrophosphorsäure an. Beide müssen natürlich den Aktivator enthalten.

Die Nierenpyrophosphatase wurde andererseits in isoliertem Zustand in der Restlösung bei Behandlung des dialysierten Nierenautolysats mit $Mg(OH)_2$ bei acetat-alkalischer Reaktion nachgewiesen. Diese Adsorptionsrestlösung enthält, wie angenommen,

den Aktivator. Man versetzt also das gereinigte Taka-Ferment mit Nierenpyrophosphatasenlösung und lässt es auf Diphenylpyrophosphorsäure einwirken. Tatsächlich wird eine reichliche Menge der Orthophosphorsäure abgespaltet. Das Experiment hat also die Berechtigung der Voraussage, dass der Aktivator unter derselben Bedingung von $\text{Mg}(\text{OH})_2$ schwer adsorbiert wird, bewiesen.

Behandeln der Leberfermentlösung in derselben Weise liefert eine Adsorptionsrestlösung, die nur Pyrophosphorsäure sehr schwach hydrolysiert. Diese Lösung sollte natürlich den Aktivator enthalten.

Wenn das Taka-Ferment mit dieser Lösung versetzt wird, wirkt das Gemisch auf Diphenylpyrophosphorsäure sehr energisch.

Auch ein anderes Experiment beweist die Wirkung des Aktivators: Die durch Erhitzen inaktivierte Nierenfermentlösung wird wieder dem gereinigten Taka-Ferment zugesetzt und auf Diphenylpyrophosphorsäure geprüft. Eine deutliche Hydrolyse tritt ein.

Die aufgestellten Fragen sind also gelöst: Die Diphenylpyrophosphorsäure wird durch die spezifische Pyrophosphatase in Anwesenheit des Aktivators zuerst in 2 Moleküle Phenylphosphorsäure aufgespalten, und diese werden dann durch die Phosphoesterase angegriffen.

Die Beziehung zwischen Pyrophosphatase und Aktivator erinnert an den Fall mit sowohl Trypsin und Enterokinase, als auch Kathepsin und Zoo-Kinase.

Die Annahme von Suzuki (1931), die er aus seinem Resultat bei der fermentativen Hydrolyse des Asparagyl-Dityrosins aufgestellt hat, ist hier besonders interessant: Wenn eine Amino-dicarbonsäure an einer Carboxylgruppe mit einem Molekül Tyrosin gebunden ist, wird das Dipeptid entweder durch nichtaktiviertes Trypsin oder durch Erepsin aufgespalten. Aber die weitere Bindung des zweiten Tyrosin-Moleküls an der anderen Carboxylgruppe macht das gebildete Tripeptid, wie Asparagyl-Dityrosin, gegen die beiden erwähnten Fermente völlig resistent. Das neue Substrat wird jedoch in bemerkenswerter Weise durch das mit

Enterokinase aktivierte Trypsin, Trypsin-Kinase, gespalten.

Die stufenweise Hydrolyse der zusammengesetzten Verbindungen ist sehr lehrreich, und in ihr ist ein Ziel der Fermentforschung vorhanden.

Selbst auf dem Gebiete der Phosphatasenstudien bietet die Natur dafür reichliches Material.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG VON SUBSTRATEN.

a. *Phenylphosphorsäure*. Dieselbe wurde nach Asakawa (1929) in hiesigem Institut dargestellt. Zu den Experimenten wurde das Na-Salz gebraucht.

b. *Pyrophosphorsäure*. Diese wurde als Natriumpyrophosphat in gewöhnlicher Weise durch Glühen von reinem sekundärem Na-Phosphat in einer Porzellenschale, bis eine herausgenommene Probe durch Silbernitratlösung nicht mehr gelb gefärbt wird, und zweimalige Umkristallisation aus heissem Wasser dargestellt. 10 Mol. Kristallwasser im lufttrocknen Zustand.

c. *Diphenylpyrophosphorsäure*. Das Kaliumsalz der Diphenylpyrophosphorsäure wurde nach Neuberg und Wagner (1926) dargestellt. Die Analyse wurde mit der im Hochvakuum über P_2O_5 bei $100^\circ C$ bis zur völligen Gewichtskonstanz getrockneten Substanz ausgeführt.

1. Phosphorbestimmung: 0.5465 g Substanz lieferten 0.2968 g $Mg_2P_2O_7$.
Für $(C_6H_5)_2K_2P_2O_7$ (406.36) ber. 15.28% P,
gef. 15.13% P
2. Aschenanalyse: 0.5196 g Substanz gaben 0.3025 g KPO_3
ber. 58.13% K P O₃
gef. 58.21% K P O₃

II. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNGEN.

Die zu den Experimenten gebrauchten Fermentlösungen wurden aus Nieren und Lebern von Schweinen, Taka-Diastase und Kaninchenblut hergestellt.

Die Nieren- und Leber-Fermentlösungen wurden nach Asakawa (1928) dargestellt (aber 3 Tage länger autolysiert) und die Taka-Phosphatase nach Kobayashi und Inouye* gereinigt.

Die Blutfermentlösung wurde vorbereitet, indem man defibriertes Kaninchenblut mit einer gleichen Menge Wasser versetzte und zwei Tage mit destilliertem Wasser dialysierte.

Das anfängliche Blutvolum wurde endlich fünffach verdünnt.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

Die Substratlösung war M/100 bei Phenylphosphat und M/200 bei Pyrophosphat und Diphenylpyrophosphat.

Die Pufferlösung war Glykokoll-Salzsäure (M/10), Acetat-Essigsäure (M/2), Glykokoll-Natron (M/10), oder Borax-Borsäure-Mischung nach Palitzsch (1915).

Die Versuche wurden bei 37°C in einem elektrisch regulierten Wasserbad ausgeführt. Ph wurde gleich nach der Anstellung der Versuche elektrisch ermittelt.

Die Versuchslösung bestand bei der Prüfung der Wirkung der dargestellten Fermentlösungen aus:

Substratlösung	5.0 ccm
Puffer	10.0 ccm
Fermentlösung	10.0 ccm
Wasser oder 2% Albuminlösung	5.0 ccm

Die abgespaltete Orthophosphorsäure wurde kolorimetrisch nach Fiske-Subbarow (1925) bestimmt. Die in den folgenden Protokollen (Tabelle I-IX) angegebenen Ziffern bedeuten die

* Das von Inouye (diese Zeitschrift[1928], 10, 135) angegebene Mischungsverhältnis von Essigsäure und Natr. Acetat bei Adsorption und beim Waschen des Adsorbats wurde irrtümlicherweise mit vertauschten Zahlen beschrieben.,

Es soll Essigsäure 42.8 ccm, Natr. Acetat 7.2 ccm statt Essigsäure 7.2 ccm, Natr. Acetat 42.8 ccm heissen. (vgl. Kobayashi, diese Zeitschrift, [1927], 8, 205).

Phosphorsäure als P in mg für 6 ccm der Versuchslösung. 100%ige Hydrolyse soll also 0.31 mg P liefern. Beim Versuch mit Diphenylpyrophosphat wurde auch das frei gewordene Phenol nach Folin-Denis (1915) kolorimetrisch bestimmt.

Auch Kontrollversuche wurden je nach Bedarf zweckentsprechend ausgeführt.

IV. ERGEBNISSE.

(A) Wirkung des Nierenferments.

TABELLE I.

Phenylphosphat

Zeit Ph	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	Spaltung in % nach 1 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
2.6	0.1195	0.2362	76.2	Glykokoll-HCl	mit Eiweisszusatz
3.5	0.1730	0.2488	80.2	Acetat-Essigsäure	„
4.4	0.1512	0.2276	73.4	„	„
5.2	0.1463	0.2130	68.7	„	„
5.9	0.1161	0.1846	59.5	„	„
7.3	0.0594	0.1149	37.0	Borax-Borsäure	„
7.6	0.0708	0.1251	40.3	„	„
8.0	0.1045	0.2096	67.6	„	„
8.5	0.1951	0.2916	94.0	„	„
9.0	0.2680	0.3087	99.6	Glykokoll-Natron	„

Die Phenylphosphatspaltung ohne Eiweisszusatz war wie folgt; die mit Eiweisszusatz ist zum Vergleich tabellarisch daneben gestellt:

Versuchslösung:

Fermentlösung (2 fach verd.)	5 ccm
Puffer	10 ccm

M/100 Phenylphosphat 5 cem
 Wasser oder 2% Albuminlösung 5 cem

TABELLE I'.

Ph	Zeit	ohne Eiweisszusatz		mit Eiweisszusatz		Arten der Pufferlösung
		in mg	in %	in mg	in %	
2.6	1 St.	0.0697	22.5	0.0769	24.8	Glykokoll-HCl
3.5	„	0.0815	26.3	0.0952	30.7	Acetat-Essigsäure
4.4	„	0.0654	21.1	0.0886	28.6	„
9.3	„	0.2796	90.2	0.2982	96.2	Glykokoll-Natron

TABELLE II.
Pyrophosphat.

Zeit Ph	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	Spaltung in % nach 1 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
2.6	0.0707	0.1206	38.9	Glykokoll-HCl	mit Eiweisszusatz
3.5	0.1091	0.2042	65.7	Acetat-Essigsäure	„
4.4	0.1090	0.1699	54.8	„	„
5.2	0.0885	0.1384	44.6	„	„
5.9	0.0600	0.0951	30.7	„	„
7.3	0.1154	0.2081	66.4	Borax-Borsäure	„
7.6	0.1311	0.2327	75.0	„	„
8.0	0.1389	0.2053	66.2	„	„
8.5	0.1291	0.1920	61.9	„	„
9.0	0.0738	0.1130	36.4	„	„

TABELLE III.
Diphenylpyrophosphat.

Zeit Ph	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	Spaltung in % nach 1 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
2.6	0.0280	0.0613	19.8	Glykokoll-HCl	mit Eiweisszusatz
3.5	0.1200	0.2020	65.1	Acetat-Essigsäure	„
„		0.1569	50.6	„	ohne Eiweisszusatz
4.4	0.0976	0.1758	56.7	„	mit Eiweisszusatz
5.2	0.0720	0.1381	44.5	„	„
5.9	0.0544	0.1091	35.1	„	„
7.3	0.0344	0.0621	20.0	Borax-Borsäure	„
7.6	0.0351	0.0888	28.6	„	„
8.0	0.0616	0.1285	41.4	„	„
8.5	0.0715	0.1641	53.0	„	„
9.0	0.0735	0.1315	42.4	„	„

Die Menge des frei gewordenen Phenols war innerhalb des Versuchsfehlers immer äquivalent mit der der Phosphorsäure; also I: I.

(B) *Wirkung des Leberferments.*TABELLE IV.
Phenylphosphat.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	Spaltung in % nach 2 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
3.5	0.2222	0.2963	95.5	Acetat-Essigsäure	ohne Eiweisszusatz
7.3	0.0272	0.0434	14.0	Borax-Borsäure	mit Eiweisszusatz
9.0	0.000	0.0266	8.6	Glykokoll-Natron	ohne Eiweisszusatz

TABELLE V.
Pyrophosphat.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	Spaltung in % nach 2 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
3.5	0.0389	0.0605	19.5	Acetat-Essigsäure	ohne Eiweisszusatz
7.3	0.000	0.0277	8.9	Borax-Borsäure	mit Eiweisszusatz
9.0	0.000	0.0212	6.8	Glykokoll-Natron	ohne Eiweisszusatz

TABELLE VI.
Diphenylpyrophosphat.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	Spaltung in % nach 2 St.	Arten der Pufferlösung	Anmerkung
3.5	0.1212	0.2207	71.2	Acetat-Essigsäure	ohne Eiweisszusatz
7.3	0.000	Spur	0	Borax-Borsäure	mit Eiweisszusatz
9.0	0.000	0.0221	7.1	Glykokoll-Natron	ohne Eiweisszusatz

(C) *Wirkung der Taka-Phosphatase.*

TABELLE VII.
Phenylphosphat.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	Spaltung in % nach 2 St.	Arten der Pufferlösung
2.2	0.0230	0.0431	13.9	Glykokoll-Salzsäure
2.6	0.0548	0.1036	33.4	„
2.9	0.0631	0.1187	38.3	„
3.5	0.0548	0.1105	35.6	Acetat-Essigsäure
5.2	0.000	0.0357	11.5	„

TABELLE VIII.
Pyrophosphat.

Zeit Ph	1 St.	2 St.	Spaltung in % nach 2 St.	Arten der Pufferlösung
2.2	0.0364	0.0486	15.6	Glykokoll-Salzsäure
2.6	0.0819	0.1345	43.4	„
2.9	0.0776	0.1360	43.9	„
3.5	0.0436	0.0701	22.6	Acetat-Essigsäure

Diphenylpyrophosphat wurde durch dieses Ferment bei allen Ph in keiner Weise aufgespalten.

(D) *Wirkung des dialysierten Kaninchenblutes.*

TABELLE IX.

Ph	Zeit in St.	Phenyl- phosphat		Pyrophosphat		Diphenyl- pyrophosphat		Arten der Pufferlösung
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %	
3.5	2	0.1411	45.5	Spur	0	0.000	0	Acetat Essigsäure
5.2	2	0.2467	79.5	Spur	0	0.900	0	„
7.3	2	0.0352	11.3	0.000	0	0.000	0	Borax- Borsäure
9.0	2	0.000	0	0	0	0.000	0	„

Die oben angegebenen Ziffern wurden durch Abzug von Kontrollwerten ermittelt. Diphenylpyrophosphat lieferte ebenfalls kein freies Phenol.

(E) *Trennung der Fermente.*

Hier muss man darauf achten, dass die Nieren- und Leberfermentlösung erst nach sechsmonatiger Aufbewahrung zur Anwen-

dung gebracht wurde, und dass der schon anfangs geringe Gehalt an Eiweiss inzwischen durch Sedimentierung weiter vermindert wurde.

Als Adsorptionsmittel benutzte ich Kaolin, Tonerde C_γ nach Willstätter (1923), kolloidale Magnesiumhydroxyd-Aufschwemmung (etwa 20%) nach Fuchs (1928), MgCO₃ (Merek), gelatinöses Ca-Phosphat (etwa 30%), gelbes Eisenhydroxydgel nach Schikorr (1930) und ausserdem Tierkohle.

Die nach dem Adsorptionsverfahren erhaltenen Fermentlösungen wurden auf Phenylphosphorsäure, Pyrophosphorsäure und Diphenylpyrophosphorsäure bei Ph 3.5 mit Essigsäure-Acetatpuffer und bei Ph 9 mit Glykokoll-Natron-Puffer geprüft.

Die Untersuchung bei Ph 2.9 mit Glykokoll-HCl-Puffer und bei Ph 5.2 mit Essigsäure-Acetat-Puffer wurde ausserdem in einigen Fällen unternommen.

Die Versuchslösung bestand bei den folgenden Experimenten durchweg aus:

Fermentlösung	4 ccm
Puffer	4 ccm
Substratlösung	2 ccm

Versuchsdauer 2 Stunden bei 37°C.

Die in den folgenden Protokollen angegebenen Ziffern bedeuten die Phosphorsäure als P in mg für 5 ccm der Versuchslösung. Die vollständige Hydrolyse liefert 0.31 mg P.

Experiment I.

Gewinnung der in saurer Reaktion wirkenden Fermentlösung aus Nierenferment.

Nierenferment	25 ccm
Tonerde-Suspension	20 ccm
M/2 Essigsäure	5 ccm

Dieses Gemisch wurde unter bisweiligem Umschütteln bei 37°C in einem elektrisch regulierten Wasserbad stehen gelassen.

Nach 1 Stunde wurde es zentrifugiert, die obenstehende Flüssigkeit über Nacht in destilliertem Wasser dialysiert und dann noch einmal zentrifugiert. Prüfung der erhaltenen Lösung bezüglich ihres Fermentgehaltes ergab das folgende Resultat:

Ph	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
3.5	0.1142	37.0	0.0789	25.4	0.0549	17.3
9.0	0.000	0	0.000	0	0.000	0

Als die Tonerde-Adsorption in acetat-alkalischer Reaktion ausgeführt wurde, zeigte sich die Adsorptionsrestlösung, nach Dialyse, unwirksam auf die drei Substrate. Elution der adsorbierten Fermente wurde mit M/10 Essigsäure ausgeführt.

Die erhaltene Lösung griff die drei Substrate in saurer Reaktion an. Die Adsorption der in saurem Medium wirkenden Fermentanteile war also umkehrbar.

Experiment II.

Isolierung des in alkalischer Reaktion wirksamen Fermentanteils aus Nierenferment.

Nierenferment	30 ccm
MgCO ₃	3 gr
M/2 Natr. Acetat	3 ccm

1 Stunde bei 37°C, dann zentrifugiert und dialysiert.

Ph	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
3.5	0.000	0	0.0561	18.1	0.000	0
9.0	0.1917	61.8	0.0920	29.7	0.0511	16.5

Experiment III.

Isolierung der bei saurer Reaktion wirkenden Pyrophosphatase.

Nierenfermentlösung	30 ccm
Mg(OH) ₂ -Aufschwemmung	3 ccm
M/2 Natr. Acetat	8 ccm

Nach 1 stündigem Stehen bei Zimmertemperatur (27°C) unter bisweiligem Umschütteln wurde das Gemisch zentrifugiert und die Restlösung über Nacht mit destilliertem Wasser dialysiert. Das endliche Volum 50 ccm.

Ph	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
2.9	0.000	0	0.0790	25.5	0.000	0
3.5	0.000	0	0.1526	49.2	0.000	0
5.2	0.000	0	0.1025	33.0	0.000	0
9.0	0.0147	4.7	0.0169	5.4	Spur	0

Die ausschliessliche Pyrophosphatspaltung wurde bei wiederholten Versuchen jedesmal bewiesen. Aber der Restgrad der bei alkalischer Reaktion (Ph 9) wirksamen Fermentanteile war oft verschieden. Bei den frischen Fermentlösungen (Nieren) fand die Adsorption manchmal nicht genug selektiv statt. In solchen Fällen konnte man durch Zusatz von Kochsalz statt der Natr.-Acetatlösung den Zweck erreichen.

Fermentlösung	50 ccm
Mg(OH) ₂ -Aufschw.	3 ccm
NaCl	0.5 gr

Die Elution der adsorbierten Fermentanteile ist trotz mehrmaliger Wiederholung fehlgeschlagen. Das Adsorbat wurde in 30 ccm Wasser fein suspendiert und durch CO₂-Leitung klar gelöst und über Nacht mit destilliertem Wasser dialysiert. Das Elut

wirkte in einigen Fällen höchstens in ganz schwachem Grad und nur auf Pyrophosphat.

Experiment IV.

Die Phenylphosphatase-Lösung, die aber nur bei saurer Reaktion wirksam ist, konnte ich relativ rein bekommen. Das Adsorptionsverfahren wurde wie bei Exper. I ausgeführt.

Leberfermentlösung	50 ccm
Tonerdesuspension	40 ccm
M/2 Essigsäure	10 ccm

Die Adsorptionsrestlösung entfaltete ihre Wirkung wie folgt:

Ph	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
	in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
2.9	0.0909	29.3	0.000	0	0.000	0
3.5	0.1294	41.7	Spur	0	Spur	0
5.2	0.0884	28.5	Spur	0	0.000	0
9.0	0.000	0	Spur	0	0.000	0

Die Tonerdeadsorption des Leberferments bei acetat-alkalischer Reaktion und die Elution bei essigsaurer verlief ganz wie beim Nierenferment.

Experiment V.

Leberfermentlösung	30 ccm
Mg(OH) ₂ -Aufschwemmung	3 ccm
M/2 Natr. Acetat	8 ccm

Nach 1 stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur (27°C) zentrifugiert. Die überstehende Lösung über Nacht mit destilliertem Wasser dialysiert.

Diese Lösung entfaltete bei Ph 3.5 eine ganz schwache hydrolytische Wirkung auf Pyrophosphat (6% in 2 Stunden) und war

unwirksam auf Phenylphosphat und Diphenylpyrophosphat. Sie ist also, im Vergleich mit der unbehandelten Leberfermentlösung, als fast inaktiv zu erwähnen, abgesehen von der geringen zurückbleibenden Pyrophosphatasenwirkung. Da sie aber, wie durch späteren Versuch bewiesen, eine gute Menge von Pyrophosphatasenaktivator enthält, wird hier ihre Herstellung besonders angegeben.

Wiedergewinnung der an $Mg(OH)_2$ adsorbierten Fermentanteile wurde vergeblich und ohne merklichen Erfolg angestrebt.

Experiment VI.

Um den Mechanismus der Diphenylpyrophosphatspaltung aufzuklären, wurde inzwischen das Adsorptionsverhältnis der Nieren- und Leber-Ferment an verschiedenen Adsorptionsmitteln untersucht.

Ich möchte hier einige Beispiele beschreiben.

Kaolinadsorptionsrestlösung von Leberferment bei Ph 4 (Ferment 40 ccm, Kaolin 2 g, Acetatpuffer 10 ccm und Wasser 20 ccm; 37°, 1 Stunde und darauffolgende Dialyse) war nur wirksam auf Phenylphosphat. Das Verhältnis war also sehr ähnlich der Tonerdebehandlung (Exper. IV).

Kaolinbehandlung derselben Fermentlösung bei Ph 7 (Phosphat-Puffer) brachte kein bemerkenswertes Resultat.

Die Adsorptionsverhältnisse der Leber- und Nieren-Fermente an Kaolin bei acetat-alkalischer Reaktion waren auch nicht erwähnenswert.

Das gelbe Eisenhydroxydgel und das Calciumphosphatgel ergaben ebenfalls keine besonderen Resultate.

Experiment VII.

Hydrolyse der Diphenylpyrophosphorsäure unter gleichzeitiger Mitwirkung der Nierenpyrophosphatase und Leberphosphoesterase.

Die nach Exper. II aus Nierenferment neu dargestellte Pyrophosphataselösung zeigte die folgenden Wirkungen:

Ph	Zeit in St.	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
3.5	2	0.000	0	0.1742	56.2	0.000	0
9.0	2	0.0152	4.9	0.0111	3.5	0.0145	4.7

Die aus Leberferment nach Exper. IV neu hergestellte Phenylphosphataselösung übte die folgenden Wirkungen aus:

Ph	Zeit in St.	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
3.5	2	0.1449	46.7	Spur	0	Spur	0
9.0	2	0.000	0	0.000	0	0.000	0

Diese zwei Fermentlösungen wurden gemischt, und ich habe sie dann auf Diphenylpyrophosphorsäure einwirken lassen. Ph 3.5.

Leberphosphoesterase	4 ccm
Nierenpyrophosphatase	4 ccm
M/2 Essigsäure-Acetat-Puffer	4 ccm
M/200 Diphenylpyrophosphat	2 ccm

Nach 2 Stunden war 38%ige Hydrolyse zu konstatieren. Die frei gewordene Orthophosphorsäure war für 7 ccm der Versuchslösung 0.1176 mg als P.

Leberphenylphosphatase konnte durch dialysierte Blutfermentlösung ersetzt werden. Eine gemischte Lösung von dieser Blutlösung und der Nierenpyrophosphatase spaltete unter denselben Bedingungen und in derselben Zeit 31.0% der zugesetzten Diphenylpyrophosphorsäure.

Experiment VIII.

Hydrolyse der Diphenylpyrophosphorsäure durch sukzessive Wirkung der Nierenpyrophosphatase und Leberphenylphosphatase.

Ich liess zuerst die eine der beiden Fermentlösungen bei Ph 3.5 zwei Stunden auf das Substrat einwirken.

Pyrophosphatase oder Phenylphosphatase	4 ccm
Puffer	4 ccm
M/200 Diphenylpyrophosphat	2 ccm

Der Versuchskolben wurde dann fünf Minuten im siedenden Wasserbade erhitzt und gleich nachher mit fliessendem Wasser abgekühlt; 4 ccm der anderen Fermentlösung wurden dann hinzugefügt, und der Versuchskolben wieder zwei Stunden in den Thermostat bei 37°C gestellt.

Die Orthophosphorsäure wurde dann bestimmt. Das Resultat wird in der folgenden Tabelle angegeben.

Nr.	Reihenfolge der Fermentwirkung			Hydrolyse in %
I	Phenylphosphatase	5 Minuten bei 100°C	Pyrophosphatase	Spur
II	Pyrophosphatase		Phenylphosphatase	44.2
III	Wasser		Phenylphosphatase	Spur
IV	Phenylphosphatase		Wasser	Spur
V	Pyrophosphatase		Wasser	0

Die Kontrollversuche (Nr. III, IV und V) bewiesen, dass die Erhitzung zwecks Fermentinaktivierung keine spontane Hydrolyse des Diphenylpyrophosphats verursachte.

Experiment IX.

Die Aktivierung der Taka-Pyrophosphatase durch Aktivator.

Für dieses Experiment wurde die Taka-Fermentlösung neu hergestellt. Wie in der folgenden Tabelle angegeben, war sie wirksamer als diejenige, die früher bei dem Versuch C gebraucht wurde.

Die Versuchsanordnung bei der Aktivitätsprüfung war genau dieselbe wie bei Versuch C.

Ph	Zeit in St.	Phenylphosphat		Pyrophosphat		Diphenylpyrophosphat	
		in mg	in %	in mg	in %	in mg	in %
2.9	1	0.2631	84,8	0.2898	93,5	Spur	0
3.5	1	0.2439	78,7	0.2666	86,0	Spur	0
5.2	1	0.2127	68,6	0.1020	32,9	0.000	0

Diphenylpyrophosphat war wieder sehr schwer spaltbar.

Seine Hydrolyse betrug selbst nach 2 Stunden nur 6% bei Ph 2.9 und 3.5.

Als aber dieses Ferment mit der aktivator-enthaltenden Lösung versetzt wurde, verursachte das Gemisch eine auffallende Hydrolyse des Diphenylpyrophosphats.

Die Versuchslösung bestand aus:

Taka-Fermentlösung	4 ccm
Aktivator-enthaltende Lösung	4 ccm
Puffer	4 ccm
M/200 Diphenylpyrophosphat	2 ccm

Nr.	Fermentlösung	Ph	Versuchsdauer	Hydrolysengrad	Anmerkung
I	Taka-Ferment + Nierenkochsaft	3.5	1 St.	28.6%	
II	Taka-Ferment + dialysierte Adsorptionsrestlösung des Nierenferments ($Mg(OH)_2$, Acetat)	3.5	1 St.	58.6%	siehe Exper. III
III	Taka-Ferment + dialysierte Adsorptionsrestlösung des Leberferments ($Mg(OH)_2$, Acetat)	3.5	2 St.	31.4%	siehe Exper. V

Der Nierenkochsaft, welcher keines der erwähnten drei Substrate angriff, wurde durch 5 minutiges Eintauchen der Nieren-

fermentlösung im siedenden Wasserbade und sofortiges Abkühlen mit Leitungswasser bereitet.

Der Aktivator scheint also gegen Wärme stabiler als das Ferment selbst zu sein und behielt nach 5 minutigem Kochen noch eine mässige Wirkung bei.

Dies war aber bei der Fermentlösung der Fall, welche, wie schon erwähnt, so arm an Eiweiss war, dass sie beim Erhitzen nur dicke weisse Trübung, aber keine Ausflockung von Eiweiss zeigte.

Bei anderen Nierenfermentlösungen, die beim Kochen starke Ausflockung des Eiweisses zeigten, verlor der Aktivator seine Wirkung schon nach 2 minutigem Stehen im siedenden Wasserbade.

Wie aus den Versuchen (Nr. II und III) klar zu ersehen, ist es immerhin sicher, dass die Pyrophosphatase erst mit Hilfe eines Aktivators Diphenylpyrophosphat angreifen kann.

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1928): Journ. of Biochem. **10**, 157.
Asakawa, K. (1929): do. **11**, 143.
Erdtman, H. (1927): Zeitschr. für physiol. Chem., **172**, 182.
Fiske, C. H. u. Subbarow, Y. (1925): Journ. of biol. Chem., **66**, 375.
Folin, O. u. Denis, W. (1915): Journ. of biol. Chem., **22**, 305.
Fuchs, H. J. (1928): Zeitschr. für Immunitätsfor. **58**, 14.
Inouye, K. (1928): Journ. of Biochem. **10**, 133.
Kay, H. D. (1928): Biochem. Journ. **22**, 1446.
Kobayashi, H. (1927): Journ. of Biochem. **8**, 205.
Kobayashi, H. (1929): do. **11**, 173.
Lohmann, K. (1928): Biochem. Zeitschr. **202**, 466.
Neuberg, C. u. Wagner, J. (1926): Biochem. Zeitschr. **171**, 485.
Schikorr, G. (1930): Kolloid Zeitschr. **52**, 25.
Suzuki, K. (1931): Journ. of Biochem. **13**, 57.
Willstätter, R. u. Kraut, H. (1923): Berichte deutsch. chem. Ges. **56**, 1117.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN PHOSPHORSTOFFWECHSEL.

I. Phosphorsäure im Blut bei Zufuhr von Cholsäure.

VON

TADAO KIMURA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 1. April 1931)

Nach den Untersuchungen von Greenwald (1916/25) sollen drei Arten von organisch gebundener Phosphorsäure im Blut vorhanden sein: Protein-, Lipoid- und säurelösliche Phosphorsäure. Und zwar sollen diese Phosphorsäureverbindungen in den Blutkörperchen enthalten sein. Dagegen ist die anorganische Phosphorsäure im Serum vorhanden. Nach Bloor (1918) ist die Proteinphosphorsäure nur in so geringer Menge vorhanden, dass man sie vollkommen ausser Acht lassen kann. Iversen und Feigl (1919, 1920) haben über die Phosphorsäure im Menschenblut Untersuchungen angestellt und gefunden, dass sie in den Blutkörperchen in anorganische Verbindungen zu 11,5 mg%, in organische zu 187 mg% enthalten ist, und dass sie im Blutplasma als anorganische Verbindung zu 10 mg%, als organische zu 1 mg% H_3PO_4 existiert.

Seitdem wurden die organischen Phosphorsäureverbindungen im Blut, bzw. im Blutkörperchen, von vielen Autoren, wie Embden (1924), Greenwald (1925), und Jost (1927), untersucht, und es wurde bewiesen, dass im Blut Diphosphoglycerinester enthalten ist, und dass dieser Ester nach Jost 75–80% der organischen Phosphorsäureverbindungen im Blut ausmacht. Auch Kay und Robison (1924) haben schon beobachtet, dass im Blut Hexosephosphorsäureester und Glycerinphosphorsäure nachweisbar sind,

und dass sie 18–36% der organischen Phosphorsäureverbindungen betragen.

Nach Lawazeck (1924) gehen die Spaltung und die Synthese der organischen Phosphorsäureester im Blut genau wie im Muskel im Sinne von Embden (1914/15, 1924) und Meyerhof (1924) vor sich. Es wird nämlich die Synthese der Ester beim Durchleiten von Luft durch das Blut oder bei Zusatz von primärem und sekundärem Phosphat und bei alkalischer Reaktion durch Zusatz von Natriumkarbonat gesteigert.

Dagegen setzt beim Durchleiten von Kohlensäure umgekehrt eine fortlaufende Spaltung der organischen Phosphorsäure ein.

Nach Martland, Hansmann und Robison (1924) wird die organische Phosphorsäurebildung durch Blutesterase katalysiert und durch die Wasserstoffionenkonzentration im Blut beeinflusst, und zwar findet bei Steigerung von $\text{pH} > 7,35$ eine Synthese, aber bei Herabsetzung desselben $< 7,35$ eine Spaltung der organischen Phosphorsäure statt.

Jost (1927) hat die organische Phosphorsäureverbindung bei der Glykolyse im Blut untersucht und gefunden, dass die anorganische Phosphorsäure bei der gesteigerten Glykolyse im Blut verschwindet, und dass diese verschwundene Phosphorsäure als Diphosphoglycerinsäureester verestert wird. Diese Veresterung soll nach ihm im anaeroben Zustand stattfinden, und zwar sollen diese Ester durch Canizzarose Reaktion bei der Glykolyse aus intermediär gebildeter Triosephosphorsäure gebildet werden. In diesem Sinne hat er Natriumdiphosphoglycerophosphat intravenös den Hunden injiziert und die Phosphorsäure im Harn untersucht. Aus dem Ergebnis hat er entnommen, dass die Diphosphoglycerinsäure eine wesentliche organische Muttersubstanz für das anorganische Phosphat im Harn darstellt, und dass dieser Phosphorsäureester bei der Regulation der Wasserstoffionenkonzentration im Blut eine wichtige Rolle spielt. Weiter hat er beobachtet, dass dieser Ester bei Acidosis in seine Komponenten gespalten wird. In der Tat haben Mariott und Haessler (1917) gefunden, dass bei Acidosis die

anorganische Phosphorsäure im Harn zum Teil aus organischen Phosphorsäureestern herkommen könnte, die in der Niere durch Phosphatase hydrolysiert im Harn ausgeschieden wurden.

Ausser der oben genannten Hexosephosphorsäure und Glycerinphosphorsäure muss es eine andere säurelösliche organisch gebundene Phosphorsäure, wie Nucleinderivate, geben.

Thannhauser und Czoniczer (1920) und Jackson (1923) haben im Menschenblut Nucleotide gefunden. Schon Bass (1914) hat behauptet, dass im Blut ausser den Spaltungs- und Oxydationsprodukten der Nucleine, wie Harnsäure, Adenin und Hypoxanthin, noch Nucleotide enthalten sein mussten. Greenwald und Gross (1922) haben aus dem Blut des Menschen Adenin und Hypoxanthin als Pikrat isoliert.

Neuerdings wurde von Fiske und Subbarow (1927) sowie von Eggleton (1927) Kreatinphosphorsäure im Muskel gefunden, und diese Autoren zeigten, dass die Kreatinphosphorsäure bei der Muskeltätigkeit aufgespalten und in der Erholungsphase wieder resynthetisiert wird. Es ist auch möglich, dass diese Kreatinphosphorsäure im Blut enthalten ist.

Nun hatten Karasawa (1926/27), Hatakeyama (1927), Sekitoo (1929) und Fuziwara (1931) die Phosphorsäure des Kaninchenharnes bei Zufuhr von Cholsäure und bei Stauungsikterus untersucht und gefunden, dass der Phosphorsäuregehalt im Harn nach einer solchen Zufuhr gesteigert wird. Somit muss die Phosphorsäure im Blut durch Zufuhr von Gallensäure oder bei Stauungsikterus, bei welchem sich die Gallensäure durch Rückfluss der Galle ins Blut vermehren dürfte, gesteigert werden.

Wie oben erwähnt, sind im Blut verschiedene organisch gebundene und anorganische Phosphorsäuren enthalten. Daher kann man wohl einen genauen Einblick in den Phosphorsäurestoffwechsel bekommen, wenn man die anorganischen und die organisch gebundenen Phosphorsäuren getrennt analysiert.

In diesem Sinne habe ich die Phosphorsäure im Blut untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden gut genährte Hunde verwendet, die vor dem Versuch wenigstens 5–7 Tage lang mit der folgenden bestimmten Nahrung gefüttert wurden und während des Versuches dieselbe Nahrung mittags erhielten. Sie bestand aus Reis: 300 g, Fischen: 70 g und wurde in 30 ccm Shoyu und 1 Liter Wasser gekocht zubereitet.

2 Stunden nach der Fütterung wurden zuerst 15 ccm Blut aus den Cubitalvenen entnommen. Bald danach wurden 0.3 ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung pro kg Körpergewicht intravenös injiziert und in Intervallen von 1–5 Stunden und weiter nach 42–48 Stunden von demselben oder einem anderen Hund dieselbe Menge von Blut entnommen.

Die anorganische Phosphorsäure und die gesamte säurelösliche Phosphorsäure im Blut wurde nach der Methode von Embden (1921) gravimetrisch bestimmt, und die Differenz zwischen beiden als organische säurelösliche Phosphorsäure berechnet.

Als Kontrolle wurden 0.3 ccm einer physiologischen Kochsalzlösung pro kg Körpergewicht anstatt der Natriumcholatlösung intravenös injiziert, oder gar nichts injiziert. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Aus den Versuchen A der Tabelle I ist ersichtlich, dass der organische und anorganische Phosphorsäuregehalt des Blutes bei Zufuhr von physiologischer Kochsalzlösung nur eine geringe Schwankung zeigt, die in der Fehlergrenze der Versuche liegt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von Bolliger (1928) überein. Auch übt die fortlaufende tägliche Blutentnahme weder auf den organischen noch auf den anorganischen Phosphorsäuregehalt einen bemerkenswerten Einfluss aus, wie aus dem Versuch B der Tabelle I zu ersehen ist.

Die Versuche 1–4 der Tabelle II zeigen, dass der organische und anorganische Phosphorsäuregehalt des Blutes eine individuelle Schwankung aufweist. Der anorganische Phosphorsäuregehalt

ERGEBNISSE.

TABELLE I (Kontrolle).

A					
Hund Nr.	St. nach der Injektion.	anorg. P mg %	gesamter säurelöslicher P mg %	org. P mg %	Bemerkung.
1	1	5.25 5.30	31.74 32.03	26.49 26.73	← physiol. Kochsalz- lösung.
2	2	3.91 4.09	28.38 28.77	24.47 24.68	
2	3	4.68 4.58	32.37 32.05	27.69 27.47	"
4	4	5.26 5.16	32.97 33.02	27.71 27.86	"
5	5	4.61 4.53	30.88 31.07	26.27 26.54	"
B					
Datum	Hund Nr.	anorg. P mg %	gesamter säurelöslicher P mg %	org. P mg %	Bemerkung.
2/X	1	5.47	32.45	26.98	täglich 15 ccm Blut ent- nommen
3	1	5.91	33.08	27.17	
4	1	5.41	31.71	26.30	
5	1	5.83	32.44	26.61	
6	1	5.79	32.54	26.75	
7	1	5.54	32.43	26.87	
8	1	5.27	30.92	25.65	
9	1	5.71	32.09	26.38	

zeigt in der ersten Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich eine 2.72%ige Vermehrung, erreicht in der zweiten Stunde sein Maximum und zeigt durchschnittlich eine 6%ige Steigerung. In der vierten Stunde wird er subnormal herabgesetzt, um nach 24–48 Stunden wieder den normalen Wert zu zeigen. (siehe Tabelle II, III, IV und Fig. 1).

TABELLE II.

Versuch 1.

St. nach Cholat- zufuhr.	anorg. P mg %	Vermeh- rungsgrad des anorg. P %	Gesamter saure- löslicher P mg %	org. P mg %	Vermeh- rungsgrad des org. P %	Bemer- kung.
1	5.43 5.55	2.21	33.25 33.76	27.82 28.21	1.40	← Cholat
2	5.63 5.91	5.16	32.16 34.36	26.53 28.45	7.23	„
3	5.50 5.87	6.73	32.02 34.15	26.52 28.28	6.64	„
4	5.69 5.62	-1.23	33.40 33.61	27.41 27.99	2.12	„
5	5.95 5.62	-5.55	33.44 29.73	26.49 24.11	8.98	„

Versuch 2.

3	4.55 4.78	5.05	25.40 27.45	20.85 22.67	8.73	„
---	--------------	------	----------------	----------------	------	---

Versuch 3.

1	5.57 5.76	3.41	30.28 30.81	24.71 25.05	1.38	„
2	5.64 5.92	4.96	30.29 34.04	24.65 28.12	14.08	„
3	4.70 4.72	0.43	32.30 35.50	27.60 30.78	11.52	„
4	4.85 4.73	-2.47	31.27 32.18	26.42 27.45	3.90	„
5	4.81 4.63	3.74	32.96 31.57	28.15 26.94	4.30	„

Versuch 4.

1	4.75 4.87	2.53	27.55 27.83	22.80 22.96	0.70	„
2	4.56 4.92	7.89	27.45 29.68	22.89 24.76	8.21	„
3	4.68 4.97	6.20	27.60 29.66	22.92 24.69	7.72	„
4	4.72 4.64	-1.69	28.05 28.94	23.33 24.30	4.16	„
5	4.31 4.01	-6.96	27.21 25.42	22.90 21.40	6.51	„

TABELLE III (Durchschnittswert).

St. nach Cholatzufuhr.	Vermehrungsgrad des anorg. P %	Vermehrungsgrad des org. P %
1	2.72	1.16
2	6.00	9.84
3	4.75	8.65
4	-1.80	3.39
5	-5.42	-6.60

Fig. 1.

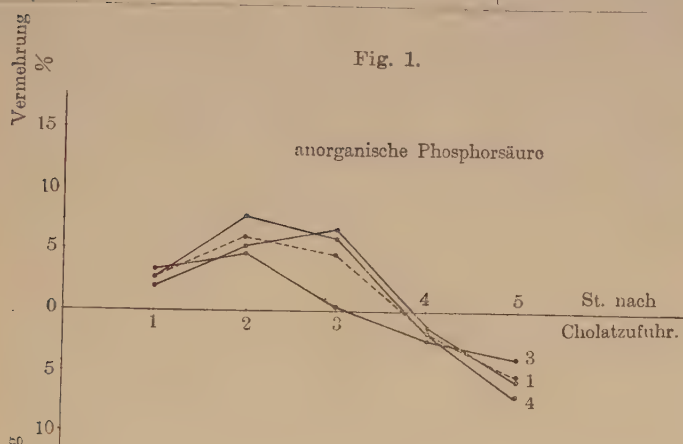
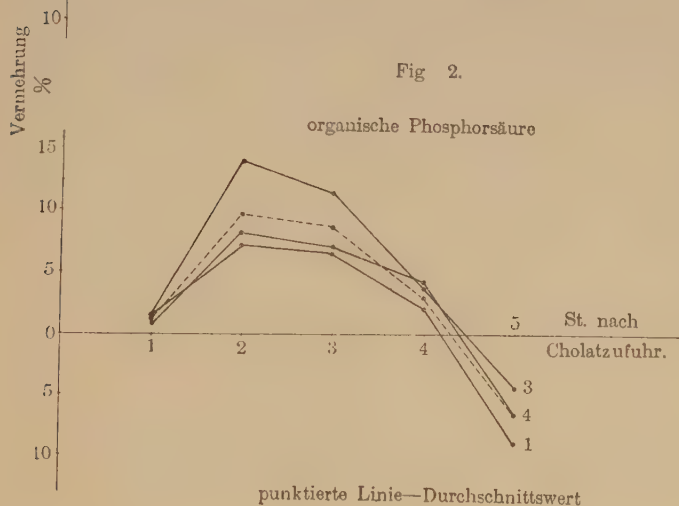


Fig. 2.



Der organische Phosphorsäuregehalt zeigt in der ersten Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure durchschnittlich eine 1.16 %ige, in der zweiten Stunde eine 9.84%ige und in der dritten Stunde eine 8.65%ige Steigerung. Also erreicht die Vermehrung des organischen Phosphorsäuregehaltes in der zweiten Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure das Maximum und der Gehalt wird in der fünften Stunde subnormal herabgesetzt, um nach 24-48 Stunden wieder seinen normalen Wert zu erreichen. (siehe Tabelle II, III, IV und Fig. 2.)

TABELLE IV.

Versuch 1.				
Datum	anorg. P mg %	gesamter säure- löslicher P mg %	org. P mg %	
2/XI	4.27	31.23	26.96	←Cholat
3	4.81	31.38	26.57	
4	4.38	30.57	26.19	
5	4.02	30.04	26.02	
6	4.54	30.39	25.85	
7	4.46	31.26	26.80	
8	4.48	30.59	26.11	
Versuch 2.				
11/X	4.33	30.35	26.02	←Cholat
12	4.55	30.70	26.15	
13	--	—	—	
14	4.65	29.45	24.80	
15	4.85	30.15	25.30	
16	4.36	30.41	26.05	
17	4.69	30.60	25.91	

Bei diesen Versuchen wurde der Einfluss der Cholsäure auf den täglichen organischen und anorganischen Phosphorsäuregehalt untersucht. Aus den Versuchen 1-2 der Tabelle IV ersieht man,

dass der organische Phosphorsäuregehalt durch die Zufuhr von Cholsäure etwas herabgesetzt, dagegen der anorganische etwas gesteigert wird. Diese Schwankung liegt in der Fehlergrenze der Untersuchung, wie aus der Tabelle I, B ersichtlich ist.

Teraoka (1931) hat kürzlich gefunden, dass die Glykolyse im Blut durch Gallensäure gehemmt wird. Es wurde schon erwähnt, dass die anorganische Phosphorsäure im Blut bei der gesteigerten Glykolyse sich vermindert, die organische Phosphorsäure im Blut sich vermehrt. Nach Uraki (1931) soll die Synthese der Hexosephosphorsäure in der Leber und im Muskel des Kaninchens durch die Gallensäure gefördert, dagegen ihre Spaltung gehemmt werden. Takata (1931) hat ebenfalls gefunden, dass die Spaltung der Glycerinphosphorsäure in der Leber und in der Niere durch die Gallensäure gehemmt wird.

Diese Daten zeigen auch, dass sich die organische Phosphorsäure im Blut durch die Zufuhr von Gallensäure vermehrt.

Durch die Untersuchungen von Karasawa (l. c.), Hatakeyama (l. c.), Okamura Takeji (1928, 1930) und Kawada (1931) wurde bewiesen, dass die Nucleinsäurespaltung durch die Nuclease der Leber durch die Gallensäure gefördert und der Nucleinsäurestoffwechsel dadurch gesteigert wird, wobei die gesteigerte Phosphorsäureausscheidung im Harn und in der Galle und Allantoinausscheidung im Harn zur Folge hat.

In oben erwähntem Sinne muss die vermehrte anorganische Phosphorsäure im Blut bei Zufuhr von Gallensäure zum Teil auf dem gesteigerten Nucleinstoffwechsel beruhen.

Die Vermehrung der organischen Phosphorsäure scheint mir entweder durch die Hexosephosphorsäure oder Glycerinphosphorsäure oder durch Nucleotide im Blut, die durch den durch Gallensäure gesteigerten Nucleinstoffwechsel geliefert werden, bedingt zu sein.

Die vermehrte Glycerinphosphorsäure, wenn wirklich vorhanden, scheint wahrscheinlich auf der gesteigerten Phosphatidspaltung durch Gallensäure zu beruhen.

Diese Fragen werden noch weiter verfolgt.

SCHLUSS.

Die organische sowie die anorganische Phosphorsäure im Blut wird durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt.

LITERATUR.

- Bloor, W. R. (1918): *Jl. of biolog. chem.*, **36**, 49.
 Bolliger, A. (1928): *Jl. of biolog. chem.*, **76**, 797.
 Bass, R. (1914): *Arch. exp. path. u. Pharma.*, **76**, 40.
 Embden, G., Griesbach, W. u. Schmitz, E. (1914): *Zs. physiolog. Chem.*, **93**, 1.
 Embden, G. u. Laquar, F. (1914): *Zs. physiolog. Chem.*, **93**, 94.
 Embden, G. (1921): *Zs. physiolog. Chem.*, **113**, 138.
 Embden, G. u. Zimmermann, M. (1924): *Zs. physiolog. Chem.*, **141**, 225.
 Eggleton, P. u. Eggleton, G. P. (1927): *Biochem.*, **Jl.**, **21**, 190.
 Feigl, J. (1919): *Bioch. Zs.*, **94**, 304.
 Fiske, C. H. u. Subbarow, Y. (1927): *Science*, **65**, 401.
 Fuziwara, K. (1931): *Jl. of Biochem.*, **13**, Heft 1.
 Greenwald, I. (1915): *Jl. of biolog. chem.*, **21**, 29.
 „ (1916): „ **25**, 431.
 „ (1925): „ **63**, 339.
 Hatakeyama, T. (1927): *Jl. of Biochem.*, **8**, 231.
 Iversen, P. (1920): *Bioch. Zs.*, **109**, 211.
 Jackson, H. Jr. (1923): *Jl. of biolog. chem.*, **57**, 121.
 Jost, H. (1927): *Zs. physiolog. Chem.*, **165**, 171.
 Karasawa, R. (1926): *Jl. of Biochem.*, **6**, 139.
 „ (1927): „ **7**, 145.
 Kay, H. D. u. Robison, R. (1924): *Biochem. Jl.*, **18**, 755 & 1139.
 Kawada, Y. (1931): *Jl. of Biochem.*, **13**, Heft 1.
 Lawazack, H. (1924): *Bioch. Zs.*, **145**, 351.
 Martland, M., Hansmann, F. S. u. Robison, R. (1924): *Biochem. Jl.*, **18**, 1152.
 Meyerhof, O. *Naturwissenschaften* 1924 Jg. 182.
 Okamura, Takeji (1928): *Jl. of Biochem.*, **8**, 391.
 Okamura, Takeji (1930): *Arb. Med. Uni. Okayama*, **2**, 245.
 Sekitoo, T. (1927): *Jl. of Biochem.*, **11**, 251.
 Teraoka, M., Uraki, Z. u. Takata, H. noch nicht veröffentlicht.
 Thannhauser, S. J. u. Czoniczer, G. (1920): *Zs. physiolog. Chem.*, **110**, 307.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF GLYCEROPHOSPHATASE.

VON

HIROSHI TAKATA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 2. April 1931)

Es ist eine feststehende Tatsache, dass Glycerophosphatase, welche Glycerinphosphorsäure in ihre Komponenten spaltet, im Pflanzen- und Tierorganismus vorkommt, wie von vielen Autoren, wie Neuberg u. Karczag (1911), Nemec (1919), Kobayashi (1927, 1928), Inouye (1928) und Grosser u. Husler (1912) bewiesen wurde. Im Jahre 1927 hat Jost Diphosphoglycerinsäure aus dem Blut von Hunden als Brucinsalz isoliert und gefunden, dass sie bei der Glykolyse im Blut gebildet und in der Niere leicht gespalten wird. Auf Grund dieser Daten hat er entsprechend den Anschauungen Robisons (1923/24) sich dahin ausgesprochen, dass die Diphosphoglycerinsäure, sowie die Glycerinphosphorsäure die wichtigsten Muttersubstanzen der Harnphosphate seien, somit diese aus den organischen Esterverbindungen des Blutes stammten und eine gewisse Rolle bei dem Regulationsmechanismus der H-Ionenkonzentration im Blut spielten.

Hosizima (1931) hat beim Hunde beobachtet, dass die organische Phosphorsäure im Blut durch Zufuhr von Gallensäure vermehrt wird. Ob die Vermehrung der organischen Phosphorsäure bedingt ist durch die Glycerinphosphorsäure oder durch die Diphosphoglycerinsäure oder durch die Hexosephosphorsäure und die Nucleotide im Blut, ist noch nicht genau bekannt.

Es ist aber schon durch die Untersuchungen von Karasawa (1926/27), Hatakeyama (1927) und Okamura Takeji (1928) festgestellt worden, dass die Spaltung der organischen Phosphorver-

bindung Nucleotide im Organismus durch Zufuhr von Gallensäure gefördert wird.

Durch die Versuche von Misaki (1927), Okamura, S. (1930) und Fuzita (1930) ist ebenfalls schon bekannt, dass die Glykogenbildung der Leber und des Muskels durch die Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird, und dass beim Abbau und Aufbau des Glykogens die organische Phosphorsäure Laktacidogen als Zwischenprodukt gebildet werden kann. Ausserdem wurde von Fiske u. Subbarow (1927) und Eggleton (1927) organische Phosphorsäure, Kreatinphosphorsäure und eine dieser entsprechende Argininphosphorsäure in den Muskeln wirbelloser Tiere gefunden.

Obwohl die Gallensäure im normalen allgemeinen Kreislauf noch nicht mit Sicherheit nachgewiesen wurde, so ist es doch sicher, dass sie bei Stauungsikterus durch Rückresorption der Galle im Blut vorhanden ist. Seit Schiff und Stadelmann ist ferner bekannt, dass die Gallensäure den enterohepatischen Kreislauf bildet. Somit ist es wohl denkbar, dass wenigstens in der Leber die Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der organischen Phosphorsäureverbindungen irgendeinen Einfluss ausübt und eine physiologische Bedeutung hat.

In diesem Sinne habe ich zuerst den Einfluss der Gallensäure auf die Glycerophosphatase in der Leber und Niere untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Methodik.

Die Glycerophosphataselösung aus der Niere und der Leber von Kaninehen wurde nach Asakawa (1928) durch Dialyse hergestellt. Sie war stark aktiv, vollkommen klar, schwach gelblich gefärbt und frei von anorganischem Phosphor. Nach Asakawa soll ihr Wirkungsoptimum bei $\text{pH}=8,8-9,0$ liegen. Somit wurde der Versuch durch Pufferung mit Glykokoll und Natronlauge bei $\text{pH}=8,8-9,0$ ausgeführt. Als Substrat wurde bei dem Versuch das

Natrium Glycerophosphat (β -Form) von E. Merck unter einmaliger Umkristallisation verwendet. Die fermentative Hydrolyse wurde bei 37°C. im Brutschrank ausgeführt. Nach 24 Stunden wurde die Versuchslösung mit 10 ccm einer 5%igen Trichloressigsäurelösung versetzt und von der Fällung abfiltriert. Aus dem klaren Filtrat wurde unter Zusatz von Magnesiamischung in Kälte das Ammonium-Magnesiumphosphat ausgefällt, und die Lösung 20 Stunden stehen gelassen und abfiltriert. Der abfiltrierte Niederschlag wurde mit 2,5%igem Ammoniak gut gewaschen und in salpetersaurer Lösung auf bekannte Weise in das Molybdat übergeführt, wobei die anorganische Phosphorsäure nach Neumann titrimetrisch ermittelt wurde. In den Protokollen bedeuten die Zahlen Phosphor in mg% der Versuchslösung. Die Pufferlösung bestand aus m/10 Glykokoll und m/10 Natronlauge. Die Versuche wurden in folgender Anordnung ausgeführt:

	A (ccm)	B (ccm)	C (ccm)	D (ccm)
1% Natr. Glycerophosphat	20	20	20	20
Fermentlösung	10	10	10	10
Pufferlösung	10	10	10	10
1% Natr. Cholat	0	1	3	5
Wasser	10	9	7	5
Toluol	1	1	1	1

	A (ccm)	B (ccm)	C (ccm)
1% Natr. Glycerophosphat	20	20	20
Fermentlösung	10	10	10
Pufferlösung	10	10	10
0,25% Natr. Cholat	0	1	2
Wasser	10	9	8
Toluol	1	1	1

ERGEBNISSE.

I. Versuch an der Niere.

Aus der Tabelle I ersieht man, dass die Spaltung der freien Phosphorsäure aus der Glycerinphosphorsäure durch Glycerophosphatase in der Niere bei Zufuhr von Cholsäure im allgemeinen herabgesetzt wird, obwohl diese Herabsetzung je nach dem Gehalt an Cholsäure ganz verschieden auftritt. Bei 0,005%igem Cholsäuregehalt wird die Phosphorsäurespaltung nämlich im Vergleich zu der Kontrolle durchschnittlich zu 5% gehemmt, bei 0,01%igem

TABELLE I (Niere).

P in mg% Puffer von pH=8,9.

Nr.	Kölbchen	A	B	C	D
1		23,822	22,160	21,772	21,496
2		24,320	21,938	21,052	20,608
3		23,588	21,300	20,668	20,248
4		23,102	21,152	19,944	19,446
5		24,072	22,050	21,390	21,052
Durchschnittswert		23,780	21,600	20,964	20,568
befreites P in %			90,8	88,1	86,5

Nr.	Kölbchen	A	B	
1		29,518	27,720	27,522
2		28,852	27,656	27,856
3		29,518	28,122	27,256
4		28,918	27,390	26,592
5		28,986	27,570	27,170
Durchschnittswert		29,158	27,690	27,270
befreites P in %			95,0	93,5

Gehalt zu 6,5%, bei 0,02%igem Gehalt zu 9,2%, bei 0,06%igem Gehalt zu 11,9%, und bei 0,1%igem Gehalt zu 13,5% herabgesetzt. Somit wird die Phosphorsäurespaltung aus Glycerinphosphorsäure durch Phosphatase in der Niere durch die Cholsäure um so stärker gehemmt, je mehr Cholsäure die Versuchslösung enthält.

II Versuch an der Leber.

Bei der Leber wurde der Versuch in folgender Anordnung ausgeführt:

	A (ccm)	B (ccm)	C (ccm)	D (ccm)
2% Natr. Glycerophosphat	10	10	10	10
Fermentlösung	20	20	20	20
Pufferlösung	10	10	10	10
1% Natr. Cholat	0	1	3	5
Wasser	10	9	7	5
Toluol	1	1	1	1

Die Phosphorsäurespaltung aus Glycerinphosphorsäure durch Leberphosphatase wird bei 0,02%igem Cholsäuregehalt durchschnittlich zu 13,7%, bei 0,06%igem zu 18,8% und bei 0,1%igem zu 22,3% im Vergleich zu der Kontrolle gehemmt (Siehe Tabelle II). Auch hier wird, genau wie in der Niere, die Phosphorsäurespaltung um so stärker durch die Cholsäure gehemmt, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist. Der Hemmungsgrad der Phosphorsäurespaltung durch die Leberphosphatase ist bei demselben Gehalt an Cholsäure viel stärker als bei der Nierenphosphatase, obwohl bei der Leber die doppelte Fermentlösung zum Versuch gebraucht wurde. Dieses Ergebnis stimmt gut mit der Tatsache überein, dass die Phosphatausscheidung im Harn stärker auftritt als in der Gallen, und dass die Phosphatase in der Niere mehr als in der Leber enthalten ist. Die Phosphorsäureausscheidung in der Galle scheint mir also durch die Gallensäure in der

Leber reguliert zu werden, wenn die Phosphorsäure in der Galle und im Harn, wie Robison (l. c.) und Jost (l. c.) annehmen, zum Teil aus der organisch gebundenen Phosphorsäure herkommen sollte.

TABELLE II (Leber).
P in mg% Puffer von pH=7,8.

Kölbchen Nr.	A	B	C	D
1	8,034	7,368	6,758	6,482
2	8,366	7,480	7,202	7,036
3	8,442	7,844	7,778	7,380
4	8,864	7,800	7,120	7,036
5	8,532	6,926	6,894	6,704
6	7,922	6,758	6,426	6,204
7	7,784	6,538	5,928	5,624
8	7,866	6,648	6,150	5,818
9	7,756	6,426	5,984	5,650
10	8,144	6,704	6,094	5,762
Durchschnittswert	8,172	7,050	6,634	6,370
befreites P in %		86,3	81,2	77,7

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Phosphorsäurespaltung aus Glycerinphosphorsäure, hervorgerufen sowohl durch Leberphosphatase als auch durch Nierenphosphatase, wird durch die Cholsäure gehemmt.

2. Diese Hemmung ist um so stärker, je mehr Cholsäure in der Versuchslösung enthalten ist.

3. Die durch Cholsäure herabgesetzte Phosphorsäurespaltung tritt bei Leberphosphatase viel stärker auf als bei Nierenphosphatase.

LITERATUR.

- Asakawa, K. (1923): *Jl. of Bioch.*, **10**, 157.
Eggleton, P. u. Eggleton, G. B. (1927): *Bioch. Jl.* **21**, 190.
Forrai, E. (1925): *Bioch. Zs.* **142**, 283.
Fiske, C. H. u. Subbarow, Y. (1927) *Science* **65**, 401.
Fuzita, S. (1930): *Arb. Med. Univ. Okayama* **2**, 151.
„ (1930): *Jl. of Bioch.*, **12**, 383.
Grosser, P. u. Husler, J. (1912): *Bioch. Zs.* **39**, 1.
Hatakeyama, T. (1927); *Jl. of Bioch.*, **8**, 261.
Hosizima, T. noch nicht veröffentlicht.
Inouye, K. (1927): *Jl. of Bioch.* **7**, 433.
Jost, H. (1927): *Zs. physiolog. Chem.*, **165**, 171.
Kobayashi, H (1926): *Jl. of Bioch.*, **6**, 261.
Karasawa, R. (1926): *Jl. of Bioch.*, **6**, 139.
Martrand, M., Hansmann, F. S. u. Robison, R. (1924): *Bioch. Jl.*
18, 1152.
Misaki, K. (1927): *Jl. of Bioch.*, **8**, 235.
Nemec, A. (1919): *Biochem. Zs.* **93**, 96.
Neuberg, C. u. Karczag, L. (1911): *Biochem. Zs.* **36**, 60.
Okamura, Takeji. (1928): *Jl. of Bioch.*, **8**, 391.
Okamura, S. (1930): *Arb. Med. Univ. Okayama* **2**, 165.
Robison, R. (1923): *Bioch. Jl.* **17**, 286.

THE REDOX-POTENTIAL OF THE LIVING TISSUE.

By

DAISABURO OKUYAMA.

(From The Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)

(Received for publication, April 12, 1931)

It was described for the first time by Helmholtz (1843) that the tissue extracts or the cell suspension exhibit a reductions potential in the absence of oxygen. More recently Gillepsie (1920) took up this problem for more intimate study. According to his opinion, the oxidative power of the tissue can be subdivided as usual into intensity and capacity factors and the oxidations-reductions potential of the tissue may be the measure of the former. He demonstrated this with various strains of bacteria; for instance, the coli, which is a facultative anaerobe, showed a high reductions potential equivalent to that of the hydrogen electrode, while most of the aeroben, at most, $E_h = -0.3$ volt.

J. Needham and D. M. Needham (1925, 1926) directly measured the redox potential of ameba by injecting the oxydations-reductions indicator of Clark. The same method was also applied by Cohen, Chambers and Reznikoff (1928) for the other kinds of unicellular organisms. Quite recently Friedheim (1929) measured the redox potential of various organs of guinea pig, rabbit, and pig with the mercury electrode in the medium of nitrogen, and found the value of $E_h = -0.34$ volt for liver and $E_h = -0.20$ volt for muscle.

Since these measurements were carried out with macerated or excised tissue, the value thus obtained can not be looked upon as physiological. It is highly desirable, therefore, to get the value shown by the tissue as it exists in vivo.

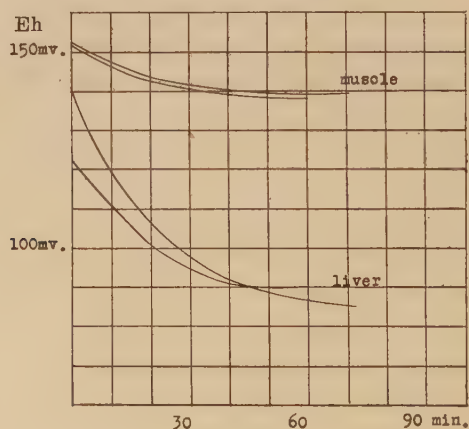
METHOD OF EXPERIMENT.

The experiments were carried out chiefly on frogs and in a few cases on rats. The animal was tied up on the board and m. quadriceps or liver was exposed. A gold plated platin wire electrode was inserted into the tissue. The animal thus operate on was brought into a glass beaker filled with Ringer's solution up to the neck. The connection with the saturated calomel cells as half element was made with the KCl-agar bridge. The E. M. F. was measured by the unipivote potentiometer of the Cambridge Instrument Co. The temperature of the experiment was 27–29°C. The potential was recalculated into Eh by adding 245 mv. which is the potential of the saturated calomel cell against normal hydrogen electrode at this temperature.

1) *The redox-potential of normal frog and rat.*

The redox-potentials of the muscle and liver of normal frog and rat were measured as described above. One of the typical examples is indicated in Fig. 1, where the shift of potential in the lapse of time after the beginning of the experiment is demonstrated.

Fig. 1. The redox-potential of the normal animals
Temperature: 29°C.



From the above data it is clear that the liver shows a decidedly greater reduction potential than the muscle. This fact stands in agreement with the observation on the oxydase activity of both tissues. It should be noted, however, that the observed value are for oxidative in comparison with those obtained by Friedheim, referred to already in the introduction.

2) *The effect of the killing of the animal on the redox-potential.*

The redox-potential observed in the above way may indicate the balanced value between the oxidative and the reductive intensities in the tissue. It is interesting to know what effect the death may have.

The experimental procedures are the same as above; when the potential showed a steady value, the animal was brought to death by strangling and the change of the potential was followed. The result is indicated in Fig. 2.

The experiment reveals clearly that death results in the lowering of the oxidations potential. The direct cause of such a lowering may be sought in the lack of oxygen supply. In the next experiment, therefore, the effect of ligature of the blood vessel was investigated.

3) *The effect of the ligature of blood vessels on the redox-potential.*

The m. gastrocnemius or m. tibialis anterior was exposed and the electrode was inserted into it as in the foregoing experiments. When the potential showed a constant value A. and V. femoralis were ligatured and the potential change was followed with the lapse of time. The result is shown in Fig. 3.

It is clear from the above experiment that the stoppage of the blood supply led to the slight but definite change of the redox-potential. There was no appreciable difference in the lowering intensity whether the arterial was bound up together with vein or not, as is shown in Fig. 4.

Fig. 2. The effect of killing of the animal (rat) on the potential.

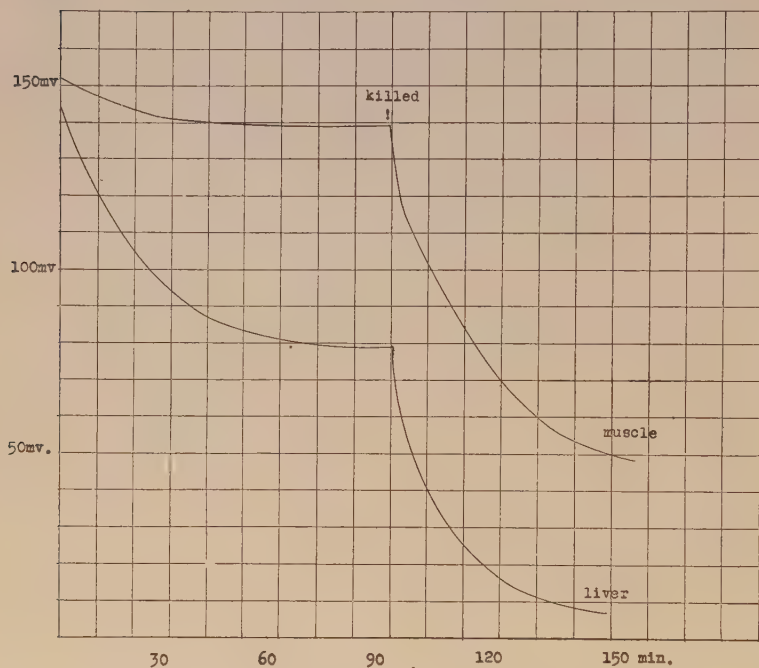


Fig. 3. The effect of the ligation of both blood vessels on the redox-potential.

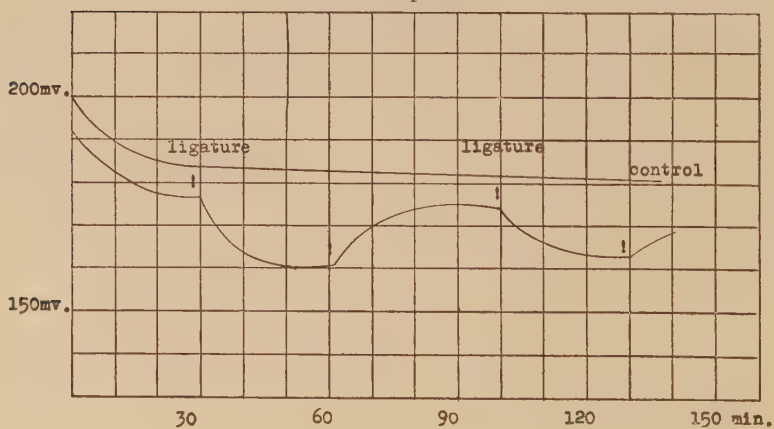
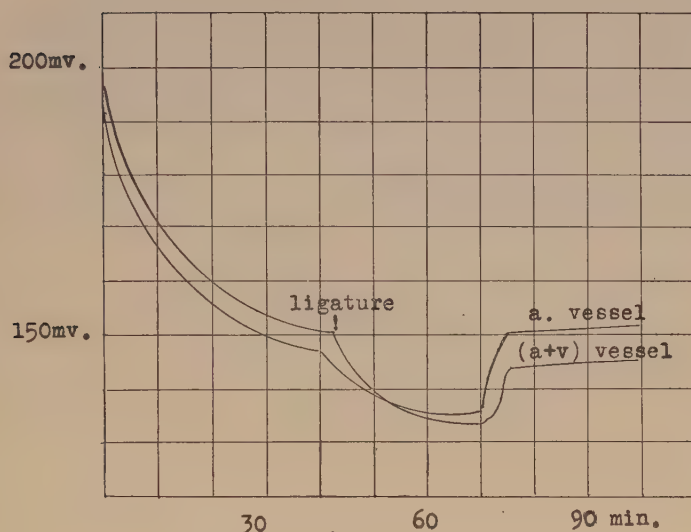


Fig. 4.



4) *The effect of the incision of the nerves.*

The experimental procedure was the same as in the previous experiment. When the potential value became steady, N. femoralis was cut off and the potential change was followed with interval. No remarkable change was observed.

TABLE I. The effect of the denervation on the redox potential.

Time		Control
min.		
5	203	198
10	192	179
15	173	167
22	156	156
30	150	152
40	145	144
	N. cut down	normal
5	145	143
10	145	142
20	144	141
30	143	140

5) *The effect of narcotics on the redox-potential of the living tissue.*

It has been tentatively proved by Warburg that the narcotic action of the drugs goes parallel to the capillary effect, which is manifested, after all, in the decrease of the oxidative activity of the tissue. It was tested, therefore, whether the ordinary narcotics such as chloroform aether and urethan may bring about the decrease of the oxidations-potential of the living tissue when the animals are narcotised by them.

When the electrodes inserted in the liver and the leg muscle showed a constant value the frog was narcotised by inhaling chloroform or aether or by injecting urethan (1 cc of 2% solution) into the lymph sack, and the potential change was followed with interval

The results are illustrated in Fig. 5, 6 and 7.

It is obvious in the above experiments that the redox-potential of the living tissue tended to be reductive when narcotics were applied, with the only exception that chloroform did not bring about any appreciable change in the liver.

The experiments were repeated on the rat with nearly the same results.

Fig. 5.

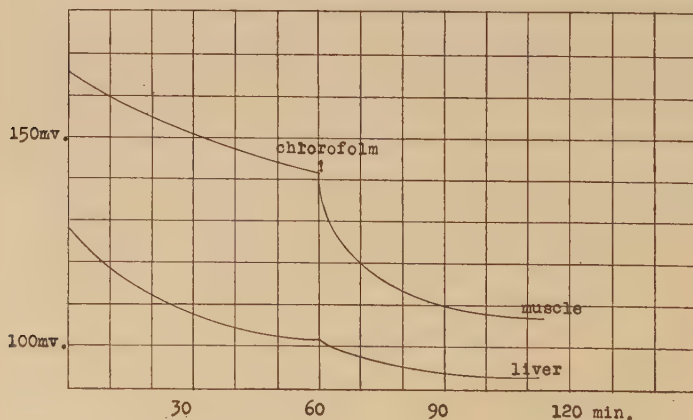


Fig. 6.

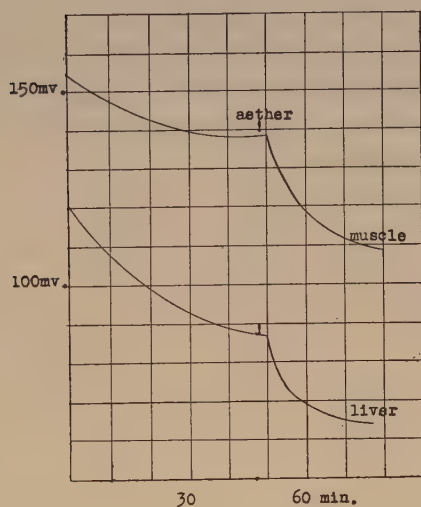
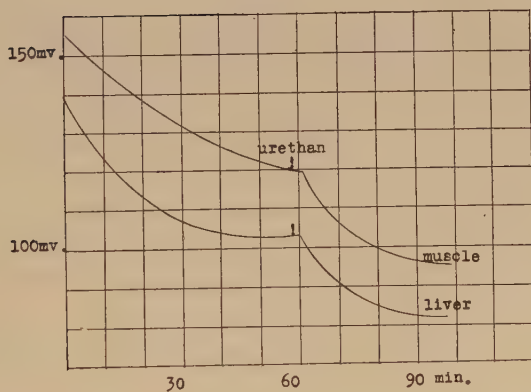


Fig. 7.

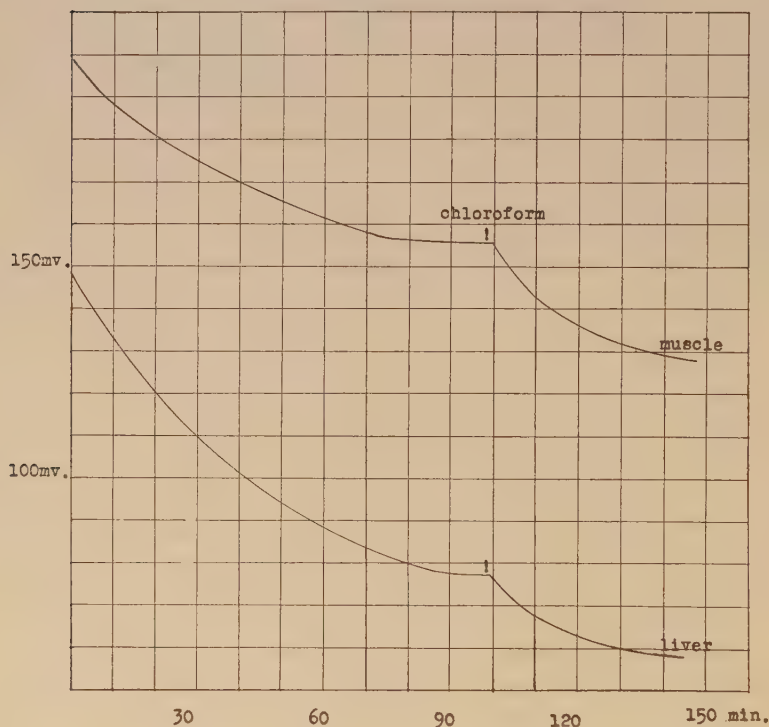


6) *The effect of narcotics on the redox-potential of the excised muscle.*

The action of narcotics as above mentioned can be also well demonstrated on the excited tissues. The liver or the leg muscle

of the frog was excited and immersed in the Ringer solution. The gold plated electrode was inserted and the potential was measured against the saturated calomel half cell. When the potential reached nearly a constant value, chloroform was added to the Ringer solution and the change of the potential was noted. The results are indicated in Fig. 8.

Fig. 8. The effect of chloroform on the redox-potential of the excited muscle.



It is noticeable in the above experiment that chloroform reduces the potential in the muscle but not appreciably in the liver.

DISCUSSION.

Life, though complicated, is nothing but the summation of processes of oxidation and reduction, when chemically analysed. The development of high reductions potential due to the active hydrogen evolved by the chemical process pictured by Wieland is shown to be essential in the vital process of the living tissues. During the due respiration this activated hydrogen seems to be neutralised by the oxygen inhaled, so that the redox-potential shows a balanced value. But if the animal is killed or the blood supply is simply stopped the potential shifts toward the reduction abruptly. The equilibrated potential and the reduced one, of various organs and tissues show different values. With liver and muscle, which are chiefly investigated in this experiment, the former showed a greater reduction potential than the latter in an ordinary atmosphere and still more pronounced in vacuum. This suggests that in muscle the oxygen seems to play a more important role than in liver.

The fact also stands in agreement with the behavior of muscle that it consumes more oxygen and also gives more intensive nadi-reaction than liver.

The effect of narcotics is quite interesting in view of the theoretical aspects of thier action. As the narcotics minimize the oxygen uptake of the tissue, their action may be interpreted as to paralyse the oxydase in the sense of Warburg. It is, therefore, expected that the effect of narcotics on the redox-potential also results in the diminution of the oxidations potential, and is really more apparent in muscle than in liver.

CONCLUSION.

1. The redox-potential of the living tissues were measured. The liver gave ca. $E_h = +100$ m.v. and the muscle $E_h = +150$ m.v.
2. The killing of the animal or the ligature of the blood vessel resulted in a strong shift of the potential toward reduction.

STUDIES ON PEROXIDASE.

I. Potentiometric studies on peroxidase

By

SHUNSUKE KOJIMA.

(From The Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, April 12, 1931.)

INTRODUCTION.

The main feature of Bach's theory on biological oxidation is the activation of molecular oxygen through the system of oxygenase and peroxidase. The former is believed to be a thermolabile substance capable of uniting with molecular oxygen to form a peroxide and the latter an agent capable of catalysing the breakdown of this peroxide, giving oxygen to the easily oxidisable substance. Though the chemical nature of the oxygenase and its modus of action has been much clarified by the works of Onslow and her coworkers (1920-1921), those of the peroxydase are still a matter of much dispute.

It is often described that the peroxidase, reacting with hydrogen peroxide, liberates active oxygen, while the catalase liberates inactive oxygen. Then is it possible to measure the intensity of this activation of oxygen by the potentiometric method as is often done with success in the determination of reducing activity in the system of dehydrogenase and the hydrogen donator?

The present work deals chiefly with this problem.

EXPERIMENTS.

Materials.

Peroxidase:—The ferment used in this experiment was prepared from horse radish. It was extracted with 50% alcohol and

then precipitated with that of higher concentration. The procedure was repeated three times and finally the precipitate was dissolved in water in an approximate concentration of 1% and kept in the ice box. This was diluted before use ten times with water.

Hydrogen peroxide:—The Merck's perhydrol was used exclusively after being neutralised with NaOH and diluted to the concentration denoted in the text.

Method.

For the determination of the potential the unipivote potentiometer of Cambridge Instrumental Co. was used. The reaction vessel was of 50 cc. capacity and was equipped with the rubber stopper which carries four bores for the electrode, the salt bridge, the gas inlet and the outlet. The electrode consisted of the platin wire sealed in the glass tube, which was filled with mercury for external conductance. As reference electrode a saturated calomel cell was used, which was connected with the reaction vessel with the agar salt bridge.

EXPERIMENT I.

Peroxidase + H_2O_2 .

It was intended at first to learn whether the activation of oxygen by peroxidase when act upon hydrogen peroxide can be measured potentiometrically. Into the reaction vessel 15 cc. of the phosphate buffer was introduced and the electrode was immersed into it after being well washed in water and ignited to red heat in the flame of pure methyl alcohol. Then the whole vessel was put into the thermostat kept at 30°C. and the potential was measured against the reference electrode. When the potential attained a constant value, 1 cc. of hydrogen peroxide solution of 0.325% concentration was introduced and the potential shift was recorded. When the concentration of hydrogen peroxide was high the potential reached immediately a definite value. But when a more dilute

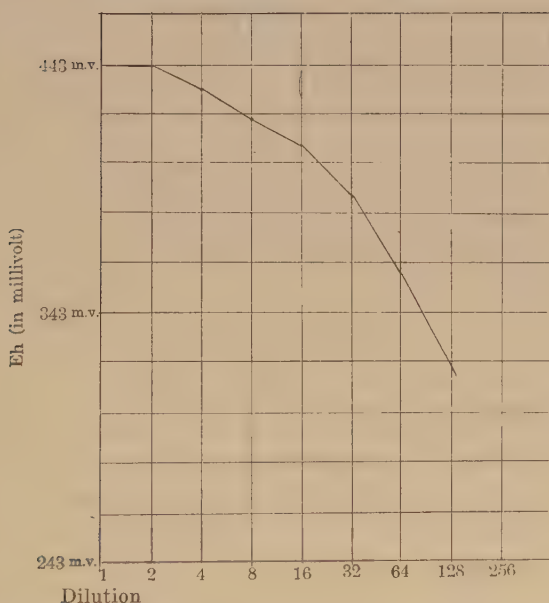
solution (1:16) was used it took several minutes. The height of oxidation potential attained is nearly linearly proportional to the logarithm of the concentration of hydrogen peroxide when this is dilute. But in higher concentrations this is independent of the concentrations and approaches to a constant value, namely 200 millivolt in reference to the saturated calomel electrode. This relation was illustrated in Fig. 1.

Fig. 1.

The oxidation potential of H_2O_2 of various concentrations.

Reaction system:—

Phosphate buffer	15.0 cc.
H_2O_2 (0.325%)	1.0 cc.



When the potential of H_2O_2 showed a constant value according to its concentration, 1cc. of the peroxidase solution was added in the expectation that the activation of oxygen might be measured with fair accuracy. But quite apart from this expectation the potential

remained constant. It should be concluded, therefore, that the activation of H_2O_2 by peroxidase does not occur as is usually understood by many investigators. But the chemical process, underlying here, may be interpreted in another way. Namely, H_2O_2 has two opposite tendencies in its molecule. One is the oxidising and the other the reducing. It is a well known fact that hydrogen peroxide exhibits its reducing ability in the titration with potassium permanganate. Therefore, it behaves as reductant against the oxidising agent of certain strength. Henceforth, in a certain concentration, hydrogen peroxide stands at the equilibrium of the oxidising and the reducing function. This can be well acknowledged when we consider that the redox-potential of the inert electrode in the hydrogen peroxide solution is fairly constant. No response of the potential at the addition of peroxidase might explain that the same principle should be held. The activation of hydrogen peroxide, even if it occurred, might be neutralised by another molecule of hydrogen peroxide. This might be the reason why the redox-potential remains constant in the system of peroxidase and hydrogen peroxide. But things are quite different when an oxidisable substance such as benzidine is present.

EXPERIMENT II.

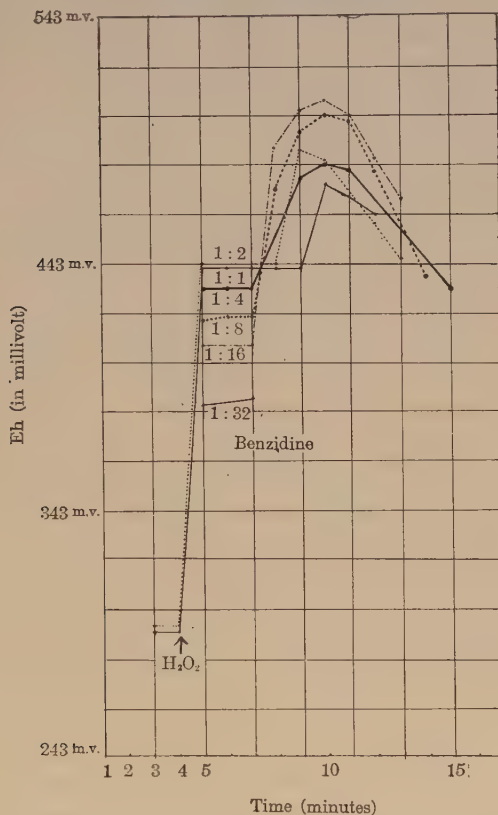
Peroxidase + H_2O_2 + Benzidine.

In the course of the above experiment when the potential of the system peroxidase + H_2O_2 of various dilutions showed a steady value, 1 cc. of the benzidine solution, which was freshly prepared by diluting ten times the 1% alcoholic solution with water, was added under a constant stirring. The shift of the potential was recorded every minute, which was illustrated in Fig. 2.

It will be evident from the above figure that the addition of benzidine causes the sudden rise of oxidation potential followed by an abrupt drop. This should be ascribed to the formation of the substance of high oxidation potential, which, is however, of the

Fig. 2.

The oxidation-reduction potential of the reaction system:—
 peroxidate + H_2O_2 + benzidine



transitory nature, because the end-product is less soluble in water and is excluded from the reacting system.

EXPERIMENT III.

peroxidase + p-cresol.

As was clearly demonstrated in the foregoing experiment, the oxidation potential of H_2O_2 + peroxidase is not any greater than

H_2O_2 alone. It should be acknowledged, therefore, that the system of H_2O_2 +peroxidase can not be interpreted in the same sense as the ordinary oxidising agent which alone gives a high oxidation potential to the inert electrode such as KMnO_4 or iodine solution. But, since it is real and apparent that this system can bring about oxidation of certain substances, whereas H_2O_2 alone is unable, the action of peroxidase should be sought in the activation of the organic molecule. Since this exists in rendering the molecule more oxidisable the chemism involved may be the activation of hydrogen in the sense of Wieland. As the benzidine itself showed some reducing ability the affair is not clear to get insight in the action of peroxidase, so p-cresol was used. This substance did not show any appreciable change at the potential, when added to the buffer solution. But on the addition of peroxidase it showed a definite drift toward the reduction as illustrated in Fig. 3. The experimental procedure is the same as in experiment II, with the only exception that purified nitrogen gas was bubbled instead of air and 1 cc. of M/100 p-cresol solution was added instead of benzidine.

A similar experiment was repeated with ortho- and meta-cresol and is also recorded in Fig. 3. As will be seen clearly from the figure, the general tendencies of three curves are the same.

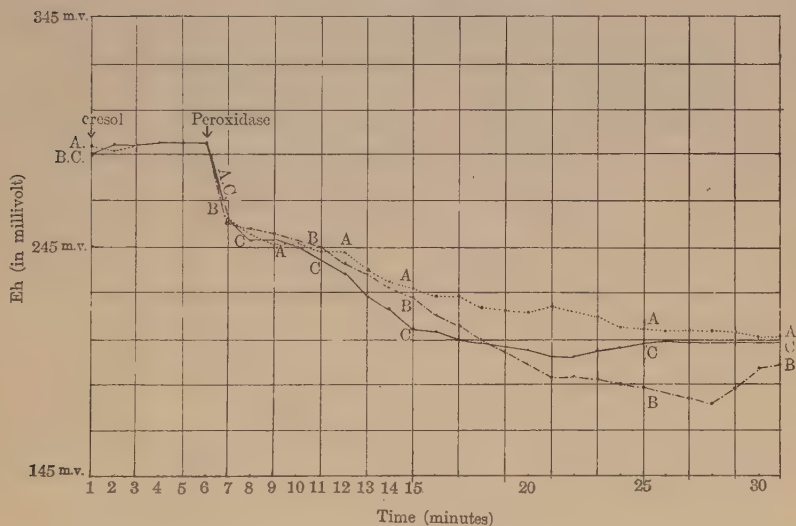
EXPERIMENT IV.

peroxidase + H_2O_2 + cresols.

In the presence of H_2O_2 , however, the enormous rise of the potential was observed as in the case of benzidine. When the phosphate buffer (pH 7.38) showed a steady value 1 cc. of H_2O_2 (M/160) was added, at which the potential jumped up and stabilised near Eh 405 millivolt. Then 1 cc. of the peroxidase (0.1%) was added with the result that no shift of the potential was accompanied. Next, 1 cc. of p-cresol of M/1000 concentration was added stirring well with aeration, at which the potential

Fig. 3.
The oxidation-reduction potential of the system:—
cresols + peroxidase

- A..... p-cresol + peroxidase
B..... m-cresol + peroxidase
C..... o-cresol + peroxidase

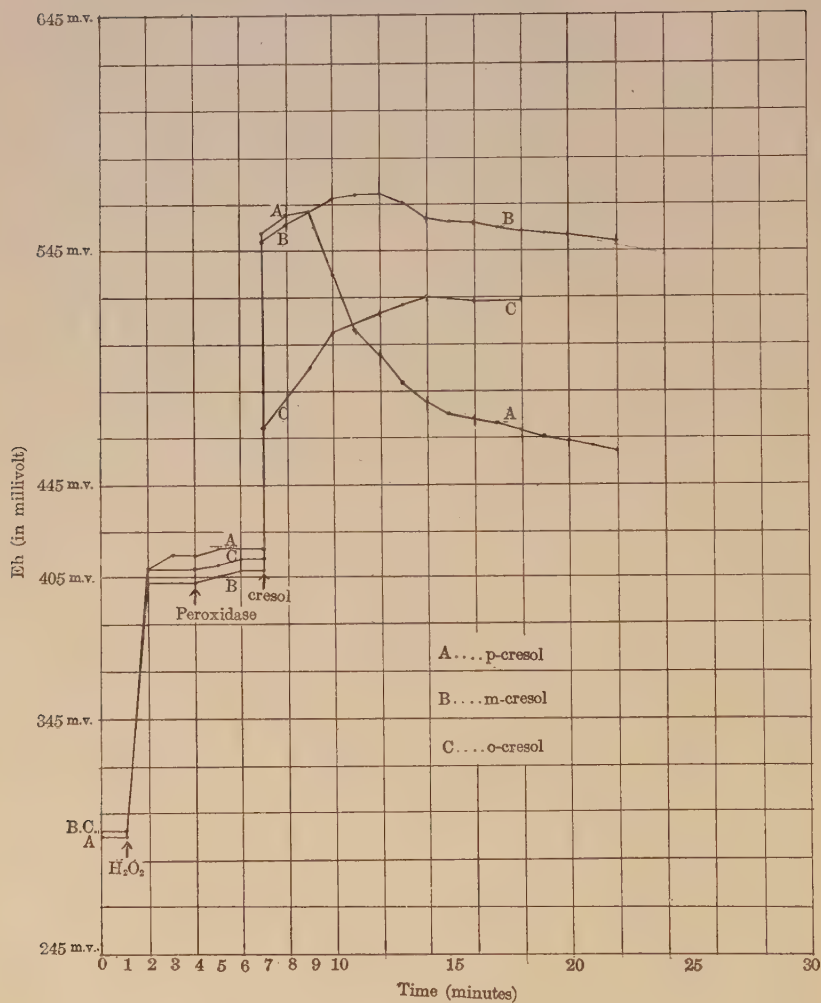


showed a sudden rise followed by a rapid drop. The whole process is illustrated by the curve A in Fig. 4. The oxidation product of p-cresol had the milky appearance at first, but at the next moment it changed to a flocculent precipitate, with a simultaneous drop of the potential.

The same rise of the potential was observed with m-cresol, but followed by no such an abrupt drop as in the case of p-cresol as illustrated by curve B. Here the brown pigment has appeared and remained unprecipitated for a certain length of time.

The result with o-cresol slightly differs from those of other isomerids. Namely, the rise of the oxidation potential is not so high and occurs more slowly, as is illustrated by the curve C in Fig. 4.

Fig. 4.
The oxidation-reduction potential of the system:—
 $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{peroxidase} + \text{cresols}$



As the oxidation of phenols usually takes place at the ortho-position to the $-\text{OH}$ radicle in the benzene ring, leading to the

formation of catechol derivatives, as is exactly proved in the case of tyrosinase of Raper (1927), the methyl group in ortho-position may offer some resistance and, therefore, causes a slow rise of the potential in the case of o-cresol.

EXPERIMENT V.

Here the effect of the concentration of H_2O_2 upon the oxidation potential of the system: peroxidase+p-cresol was studied. The results are summarised in Table I, where the redox-potentials at the equilibrium after the addition of 1 cc. of H_2O_2 of different concentrations and 1 cc. of p-cresol are given in the second and the third columns respectively.

The value given in the last column represents the highest potential attained at the addition of peroxidase.

TABLE I.

The influence of the concentration of H_2O_2 upon the magnitude of the oxidation potential of the system:
p-cresol+peroxidase

Concentration of hydrogen peroxide	The oxidation potential (Eh) at the addition of			
	phosphate buffer	H_2O_2	p-cresol	peroxidase (0.1%)
1/10 Mol	304	441	446	466
1/20 "	312	441	443	463
1/40 "	306	431	442	488
1/80 "	308	421	436	546
1/160 "	306	411	421	552
1/320 "	304	390	392	543
1/640 "	304	358	349	453
1/1280 "	306	320	320	391

One of the remarkable features in the above table is the fact that, when the concentration of hydrogen peroxide is low the oxidation potential exhibited at the addition of p-cresol is rather high.

This phenomenon might be explained by assuming that all molecules of H_2O_2 are used up in oxidising the cresol. When there is an excess of H_2O_2 , however, then this tends to neutralise the oxidised molecule so that the potential does not run so high.

EXPERIMENT VI.

$H_2O_2 + \text{peroxidase} + \text{phenol-derivatives.}$

The observation in the foregoing experiment was extended for a number of other phenol derivatives. The results are summarized in Table II. The experimental procedure is quite the same as in the foregoing experiments.

TABLE II.

	The equilibrated potential (Eh) at the addition of			
	Buffer 15 cc	M/120 H_2O_2 1 cc.	Phenol de- rivative 1 cc.	Peroxidase 1 cc.
Phenol	303	411	413	511
P-cresol	303	397	498	585
M-cresol	301	398	399	596
O-cresol	297	397	401	515
Tyrosine	293	401	367	437
Phenylalanine	294	391	391	425
Vanillin	309	408	441	607
Orcin	311	397	397	543
Tryptophan	308	411	413	425
Anilinhydrochloride	295	397	378	434
Para-amino benzoic acid	303	381	394	393
P-nitrophenol	306	411	411	411
Diphenylalanine	311	407	407	407

It is clear from the above table that the chemical constitution has a direct bearing on the magnitude of the oxidation potential developed at the addition of peroxidase.

If we compare the chemical constitution with the stability of the oxidation product we find that there exists a definite relation. Namely, the oxidation products of the phenol derivatives, which possess $-OH$ group at the meta-position to CH_3 such as meta-cresol and orcin, are stable, while those of para position such as para-cresol and vanillin are liable to flocculate.

The aromatic amino acids such as tyrosine, phenyl-alanine and tryptophan seem to be oxidised by peroxidase and hydrogen peroxide.

The oxidation product of tyrosine also gives a slight but definite oxidation potential, which is not the case with tyrosinase as is observed by Okuyama in this laboratory (1929).

EXPERIMENT VII.

H₂O₂ + Blood peroxidase + Benzdine or p-cresol.

In the foregoing experiments peroxidase prepared from horse radish was used. Here the peroxidase of animal origin, namely that of the blood, was tried. The experimental procedure is quite the same as in the previous one. The result obtained is illustrated in Fig. 5.

In comparison with the results of the peroxidase from horse radish the maximal oxidation potential attained at the addition of this blood peroxidase to the system H_2O_2 + benzdine is slightly higher than that of horse radish, while in the presence of p-cresol instead of benzdine the reverse is the case.

EXPERIMENTAL VIII.

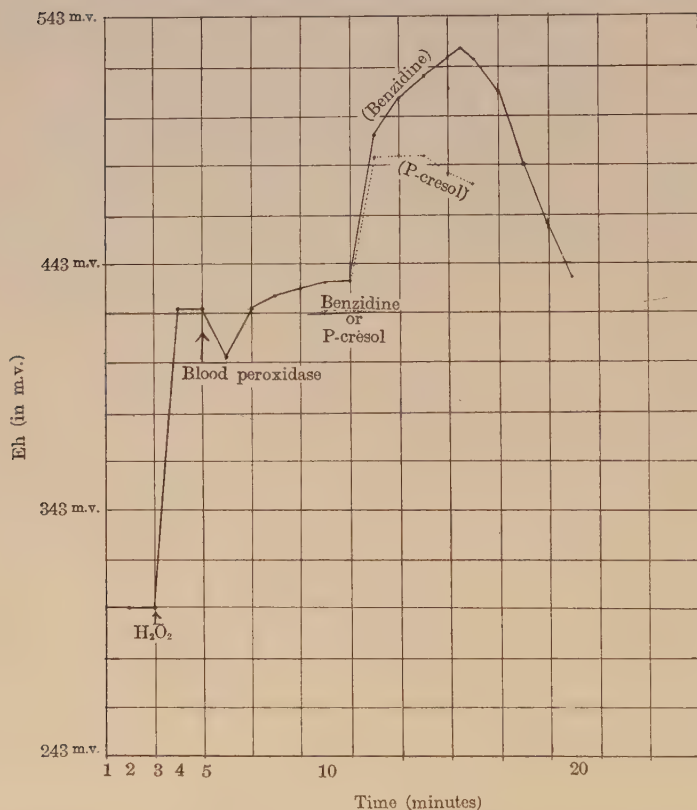
The effect of various substances upon the magnitude of the oxidation potential of the system:

peroxidase + H₂O₂ + p-cresol.

It is attempted in the following experiment to investigate whether a readily oxidisable substance can reduce the height of

Fig. 5.

The oxidation-reduction potential of the system:—
 H_2O_2 + blood peroxidase + benzidines or p-cresol.

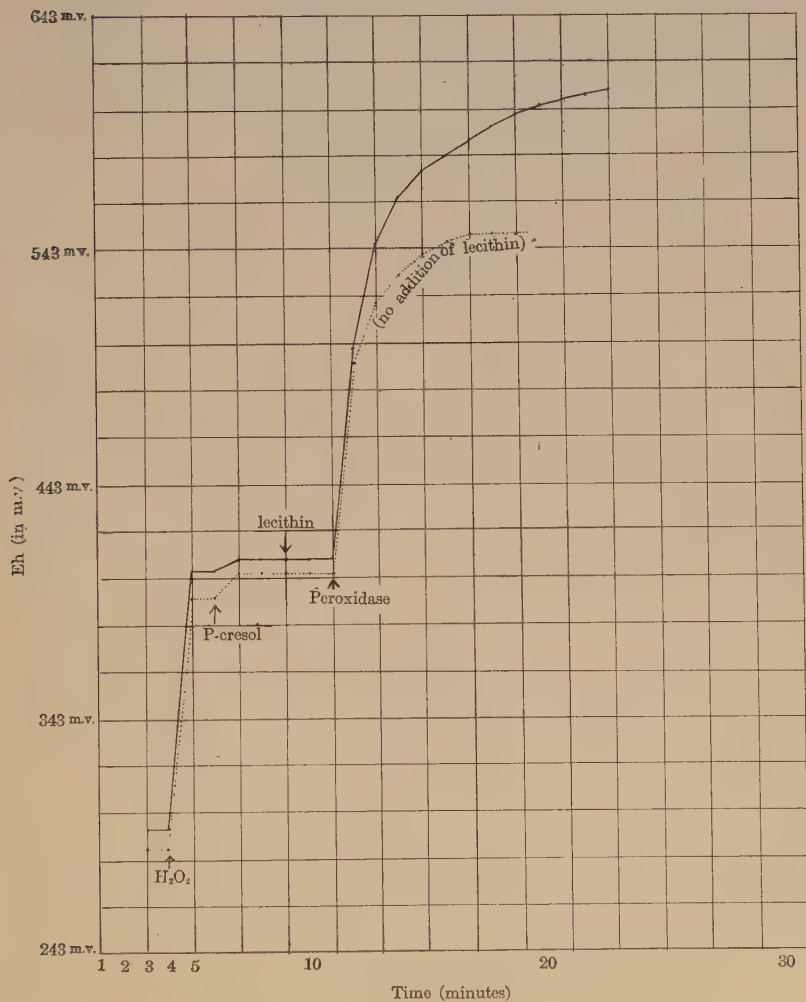
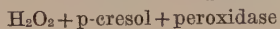


the oxidation potential induced by the oxidised product of p-cresol. At first glycine was tried, but it exerted no influence. Next, lecithin was examined. Since the substance has an unsaturated linkage in its molecule it was expected that oxidation takes place here readily with the consequent drop of the potential. But the result was quite the reverse. The potential is higher in the presence of lecithin than in its absence, as will be seen clearly in

Fig. 6. Lecithin seems, therefore, to stabilise the oxidised product from inactivation.

Fig. 6.

The effect of lecithin on the oxidation potential of the system:—



DISCUSSION.

From the foregoing experiments we are justified in concluding that peroxidase does not liberate the active oxygen from H_2O_2 or does not activate it. The oxidation intensities of H_2O_2 alone or in cooperation with peroxydase are substantially the same as far as the potentiometric method can be trusted. The role of peroxidase, therefore, in the active oxidation of, for instance, p-cresol should be sought in the activation of this molecule. The experiment justifies this statement as it clearly demonstrates that p-cresol gives more reduction potential in the presence of peroxidase. It is apparent thermodynamically that any substance of lower reduction potential is more readily oxidised than that of a higher one.

The enormous high oxidation potential of the oxidised substance of p-cresol should be explained by assuming that the change of p-cresol to the oxidised form is an irreversible process so that the potential might be simply the function of the concentration of the oxidised substance. When there exists an excess of H_2O_2 , however, this may serve just as a buffer. But when the concentration of H_2O_2 is just enough to transform all molecules of p-cresol to an oxidised form, then the potential is highest. Experiment V gave conclusive evidence in this concern.

As to the chemical nature of this oxidised form, nothing definite can be said. But the idea that here quinone was produced is most likely, which was substantially proved in the case of tyrosinase by Raper. The transitory nature of this oxidised product also stands in agreement with this conception.

CONCLUSIONS.

1. The activation of H_2O_2 by peroxidase can not be ascertained by the potentiometrical method.
2. Peroxidase causes the slight shift of the potential toward the reduction when acting upon cresols.

3. When benzidine or cresols is added to the system of peroxidase and H_2O_2 , a sudden rise of the oxidation potential ensues.

4. The magnitude of this potential rise and the behavior of the reaction-product were studied with various phenol derivatives.

REFERENCE

- Okuyama (1929): *J. Biochemistry*, **10**, 473.
Onslow, M. W. (1920-1921): *Biochem. J.*, **14**, 535, **15**, 107.
Raper (1927): *Biochem. J.*, **21**, 89, 1370.
Raper and Happold (1925): *Biochem. J.*, **19**, 92.

STUDIES ON PEROXIDASE.

II. The effect of peroxidase on the bactericidal action of phenols.

By

SHUNSUKE KOJIMA.

(From The Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University, Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, April 12, 1931)

INTRODUCTION.

Since Lister first introduced in 1867 the use of phenol in surgical treatment and germicidal action was substantially proved by R. Koch (1881), a number of papers have appeared dealing with the real chemism involved in their action. Thus Reichel (1909) believed the phenol to be a protoplasmic poison including a coagulation of protein. Bechhold (1922) maintained the idea, based on the experiment carried out by Herzog and Betzel (1910-1911), that the combination of phenol and protein is of the nature of the adsorption. Copper and Woodaus (1923) found that there was a parallelism between the denaturation of proteins and bactericidal action of phenols. They suggested, however, that the germicidal action may be due not to an actual separation of the cell-proteins, but to an enlargement of the colloidal units as a result of denaturation and transfer of water to the protein phase; the surface area of the disperse phase is thereby diminished, and sufficient retardation in metabolism may take place to cause finally the death of the organism.

All of the work enumerated above indicates that the essential feature of the bactericidal action of phenol lies in the denaturation of the protein of cell protoplasm. On the other hand, however, some authors maintain that the action is connected with certain

roles of oxygen. Thus, Schubert and Richter (1925) postulated the idea that phenols, owing to auto-oxidation, take off oxygen from the surroundings of bacteria and cause the asphyxia. In this connection reference may be made also to the work of Copper and Mason (1928), which showed that the germicidal action of catechol, quinone and pyrogallol toward *Bact. coli* is more pronounced in aerobic culture than in anaerobic. A similar observation was also made by Scott (1928), who demonstrated that the concentration of phenol to initiate the death of aerobic bacteria was 0.5%, while that of anaerobic was more than 5%.

Since this difference of the bactericidal action of phenol can not be sought in the precipitability of proteins of bacteria cultivated with the presence of oxygen or in the absence, we are forced to believe that oxygen itself may be involved in the chemism underlying the action of phenol. This paper gives a more positive result in this respect.

EXPERIMENTS.

The experimental method.

The test of the bactericidal action was carried out by counting the number of bacteria which survived after exposure to the test-substance for a certain length of time, usually one hour, at the room temperature. For counting, the dilution method was used. Ten platinum loopfuls of 24 hours culture were suspended in 10 cc. of the physiological salt solution in a stoppered conic flask of 50 cc. capacity. An aliquot portion of this stock suspension was mixed with the bactericidal substance in the test tubes. At the lapse of one hour, a certain volume of the suspension was pipetted out, diluted with Ringer solution and poured over the agar plate as usual. After being incubated for a certain length of time, the number of the colonies on the plate were recorded.

The bacteria used in the experiment were *Bact. coli*, *Staphylococcus aureus*, *B. proteus*, *B. mesentericus*, *B. phyceaneus* and

B. prodigiosus, which were furnished from the Department of Bacteriology of this University.

The sterilisation of the peroxidase solution was carried out by filtering it through a Berkefeld (No. II) porcelain candle into a sterile bottle. The bottle was then placed in the ice box.

Experiment I.—The effect of pH on the coagulation of protein by phenols and on their bactericidal power.

It is usually assumed that the coagulation of the protein by phenol occurs most readily at the isoelectric point of protein. If the bactericidal action of phenol is due to the denaturation or coagulation of protein then the effect of pH should be the same in both cases. But as is shown in the next experiment this is not really the case.

The experiment was planned to know the minimal concentration of phenol that causes the precipitation of egg-albumin at various pH. Into a series of test tubes, 3 cc. of phenol solution of various dilutions and 2 cc. of buffer solution of various pH were introduced. The buffer solution was made of a mixture of acetic acid and sodium acetate of 0.2 mol concentration for the range of pH from 3.6 to 5.4 and of phosphate mixture from 5.9 to 7.4. After being well mixed, there was added 1 cc. of the 1% egg-albumin solution, which was simply prepared by diluting the egg-white with water and thus filtering off the resulting precipitate of globulin. After it had stood one hour at room temperature cloudiness was observed. The results are indicated in Table I.

To test the bactericidal power of phenol, the same experimental procedure was followed with the only difference that 1 cc. of coli suspension, prepared as is already described in the foregoing paragraph, was added instead of the albumin solution. At the end of one hour, 0.1 cc. of the test solution was submitted for culture. The results are indicated in Table II, together with those of p-, o- and m-cresol.

TABLE I.

The effect of pH on the coagulation of egg-albumin by phenol, p-, o- and m-cresol.

pH \ conc.		M/5	M/8	M/10	M/20	M/40	control
phenol	3.6	—	—	—	—	—	—
	4.2	±	±	±	—	—	—
	4.8	+	±	±	—	—	—
	5.4	+	±	—	—	—	—
	5.9	+	—	—	—	—	—
	6.64	+	—	—	—	—	—
	7.4	±	—	—	—	—	—
pH \ conc.		M/20	M/25	M/30	M/40	M/80	control
o-cresol	3.6	—	—	—	—	—	—
	4.2	+	—	—	—	—	—
	4.8	++	±	—	—	—	—
	5.4	++	±	—	—	—	—
	5.9	+	—	—	—	—	—
	6.64	±	—	—	—	—	—
	7.4	±	—	—	—	—	—
m-cresol	3.6	—	—	—	—	—	—
	4.2	+	±	—	—	—	—
	4.8	++	±	—	—	—	—
	5.4	++	±	—	—	—	—
	5.9	+	±	—	—	—	—
	6.64	±	—	—	—	—	—
	7.4	±	—	—	—	—	—
p-cresol	3.6	—	—	—	—	—	—
	4.2	+	±	—	—	—	—
	4.8	++	±	±	—	—	—
	5.4	++	±	—	—	—	—
	5.9	+	±	—	—	—	—
	6.64	±	—	—	—	—	—
	7.4	±	—	—	—	—	—

N.B. ++ denotes the precipitation of protein.

+ denotes intense cloudiness.

± denotes slight cloudiness.

— denotes no cloudiness.

TABLE II.

The effect of pH on the bactericidal power of phenols.

pH \ conc.		M/10	M/20	M/40
phenol	3.6	—	+	++
	4.8	—	+	
	5.4	—	+	
	5.9	—	+	
	7.4	—	++	
conc. \ pH		M/30	M/40	M/80
o-cresol	3.6	—	—	++
	4.8	—	+	
	5.4	—	+	
	5.9	—	++	
	7.4	—	++	
m-cresol	3.6	—	—	++
	4.8	—	+	
	5.4	—	+	
	5.9	—	++	
	7.4	—	++	
p-cresol	3.6	—	—	++
	4.8	—	+	
	5.4	—	+	
	5.9	—	++	
	7.4	—	++	

N.B. ++ denotes innumerable colonies.

+ denotes about 40–100 colonies.

— none.

In comparing the above two tables we see that the coagulation of protein and the bactericidal action of phenol do not go hand in hand in every detail. The following differences may be noticeable.

1. The concentration of phenols that causes the coagulation of protein is higher than that required for the bactericide.

2. The optimal acidity of the coagulation exists at the vicinity of pH 4.8 corresponding to the isoelectric point of the protein, whereas the bactericidal action occurs easily at the more acidic side in the concentration of M/40. But, when the concentration increased to M/30, the action became independent of pH. That is even at the alkalinity of pH 7.4, which prevails in the living cell and where the protein does not coagulate, it was still apparent.

It might be concluded, therefore, that in addition to the coagulation of protein some other factors may intervene in the bactericidal action of phenol. Of course, the lowering of colloidgenity in an other phase than protein in the protoplasm may take place, but some concern of the oxidative process can not be overlooked, as is substantially proved in the following experiments.

Experiment II.—The effect of oxygen on the bactericidal power of phenols.

As is fully discussed in the introduction some rôle of oxygen in the germicidal action of phenol is anticipated. To produce evidence the following experiment was carried out.

Into the vacuum tube of Thunberg there were introduced 2 cc. of M/15 phosphate buffer of pH 7.4, 2.5 cc. of phenol solution and 0.5 cc. of bacterial suspension. Then the tube was evacuated. For the aerobic system a similar mixture was prepared in the test tube and exposed to the air freely. After standing one hour, 0.02 cc. of both solutions were submitted for cultures. The results are tabulated in Table III a, b.

It is apparent from the above tables that phenols exhibit more pronounced bactericidal power in the presence of oxygen than in

TABLE III(a).

The effect of oxygen on the bactericidal power of phenol.

Bact.	No. of Exp.	Aerobic	An-aerobic	Control	Concentration of phenol
<i>B. pyocyaneus.</i>	{ 1. 2.	298 339	403 384	15200	M/20
<i>B. proteus</i>	{ 1. 2.	300 602	800 946	20900	M/15
<i>Bact. coli communis.</i>	{ 1. 2. 3.	10 41 0	51 78 9	37600	M/15
<i>B. prodigiosus.</i>	{ 1. 2.	2 0	226 221	23000	M/10
<i>Staphylococcus aureus.</i>	{ 1. 2.	111 9	139 16	21700	M/10
<i>B. Mesentericus.</i>	{ 1. 2. 3.	119 96 159	141 136 284	1800	M/4

TABLE III(b).

The effect of oxygen on the bactericidal power of p-cresol.

Bact.	No. of Exp.	Aerobic	An-aerobic	Control	Concentration of p-cresol
<i>B. pyocyaneus.</i>	{ 1. 2.	737 +	1644 ++	7400	M/60
<i>B. proteus.</i>	{ 1. 2.	37 9	96 39	21700	M/35
<i>Bact. coli communis.</i>	{ 1. 2.	289 91	547 701	14100	M/40
<i>B. prodigiosus.</i>	{ 1. 2.	202 320	273 391	8300	M/35
<i>Staphylococcus aureus.</i>	{ 1. 2.	76 3	138 6	700	M/30
<i>B. Mesentericus.</i>	{ 1. 2.	17 20	24 25	24	M/12.5

its absence. The observation of Scott, therefore, may be interpreted by assuming that the difference of the resistance against phenol of anaerobic and aerobic bacteria does not exist in the protoplasm of both bacteria, but rather in the involvement of oxygen in the reaction system. Then the question arises what is the essential nature of the rôle of oxygen. If oxygen participates in the development of a certain oxidising poison in conjunction with phenol, then the bactericidal power of the latter should be ascribed partially to this in addition to the protein precipitation. Then the resistance of various bacteria toward phenol must show a certain resemblance toward oxidising bactericidal substances such as H_2O_2 , $KMnO_4$, etc.

In the following experiment the bactericidal powers of phenols upon various bacteria were compared with those of hydrogen peroxide and potassium permanganate.

5 cc. of the test solution of various dilution was buffered with 4 cc. of M/15 phosphate mixture of pH 7.4 and 1 cc. of bacterial suspension was added. The bacteria used here, are the same as those used in the foregoing experiment. After the lapse of one hour, 0.1 cc. of the mixture was submitted for culture, and the colonies were counted. The results are tabulated in Table IV 1, 2, 3.

TABLE IV(1).

The bactericidal action of phenol upon various bacteria.

<div>conc. of phenol</div> <div>Bact.</div>	M/4	M/8	M/10	M/20	Control
B. mesentericus.	+	++	++	++	63.10 ⁴
Staphylococcus aureus.	0	+	++	++	701.10 ⁴
B. prodigiosus.	0	20 colonies	+	++	492.10 ⁴
Bact. coli comm.			0	++	561.10 ⁴
B. proteus.			0	++	924.10 ⁴
B. pyocyaneus.			0	+	840.10 ⁴

TABLE IV(2).

The bactericidal action of p-cresol upon various bacteria.

conc. of p-cresol Bacteria	M/20	M/25	M/30	M/32	M/35	M/40	Control
B. mesentericus.	+						30.10 ⁴
Staphylococcus aureus.	0	7	398				71.10 ⁴
B. prodigiosus.			0	288			115.10 ⁴
Bact. coli comm.			0	4	86		59.10 ⁴
B. proteus			0	4	innumerable		53.10 ⁴
B. pyocyaneus.						0	63.10 ⁴

TABLE IV(3).

The bactericidal action of hydrogen peroxide upon various bacteria.

conc. of H ₂ O ₂ Bacteria	M/4	M/8	M/10	M/20	M/40
B. mesentericus.	++	++	++ ++		
Staphylococcus aureus.	+	++	++ ++		
B. proteus.	0	++	++		
B. pyocyaneus.	0	1	8	++	
B. prodigiosus			0	+	
Bact. coli comm.				0	++

From the above tables various bacteria can be placed in the following increasing order of resistance.

TABLE IV(4).

The bactericidal action of potassium permanganate upon various bacteria.

<div>conc. of KMnO₄</div> <div>Bacteria.</div>	M/5	M/10	M/640	M/1280	M/2560	M/5120	M/10240	M/20480	M/40960
B. mesentericus.	+	++							
B. proteus.			0	++					
Staphylococcus aureus.			0	19	61	++			
Bact. coli comm.					0	19	+		
B. prodigiosus.						0	3	+	
B. pyocyaneus.							0	4	++

Toward phenol: B. pyocyaneus, B. proteus, Bact. coli, B. prodigiosus, Staphylococcus aureus and B. mesentericus.

Toward p-cresol: B. pyocyaneus, B. proteus, Bact. coli, B. prodigiosus, Staphylococcus aureus and B. mesentericus.

Toward hydrogen peroxide: Bact. coli, B. prodigiosus, B. pyocyaneus, B. proteus, Staphylococcus aureus and B. mesentericus.

Toward potassium permanganate: B. pyocynaeus, B. prodigiosus, Bact. coli, Staphylococcus aureus, B. proteus and B. mesentericus.

Anonymously B. mesentericus showed the strongest resistance toward all kinds of germicidal agents, while B. pyocyaneus the weakest except for hydrogen peroxide. Though there exists a slight deviation, we can say that on the whole the behaviour of various bacteria toward phenol and other oxidising agents are similar. We are inclined, therefore, to believe that the bactericidal action of phenol is partly due to the oxidation in addition to the coagulation of protoplasm.

Since phenol itself, however, induces no oxidation in the presence of oxygen, some process should occur which confers on phenol the ability to perform the oxidation.

As is well known, phenol is a compound easily oxidised to quinone by various systems of biological interest, namely by laccase, by tyrosinase and by peroxydase. Among them the peroxidase is proved by many investigators to be present usually in most bacteria. Moreover, according to the works of McLeod and others (1922–1923, 1924), hydrogen peroxide is usually produced in the course of the metabolic process of bacteria, which in conjunction with the peroxidase may give rise to the oxidation of phenol.

Experiment III.—Can the peroxidase system oxidise the phenol to confer the high bactericidal action?

It is now to be definitely proved whether the peroxidase system induces phenol to accentuate its bactericidal power. For this purpose the following experiments were carried out. In a series of test tubes the various mixtures of the compositions as indicated in Table V were prepared.

TABLE V.

No. of test tube.	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Reagents.								
M/15 phosphate buffer (pH 7.5)	2	2	2	2	2	2	2	2
Distilled water	9	7.5	8	6.5	8	6.5	7	5.5
M/25 hydrogen peroxide	0	0	1	1	0	0	1	1
0.5% peroxidase.	0	0	0	0	1	1	1	1
M/10 phenol	0	1.5	0	1.5	0	1.5	0	1.5

(N.B. The number in each column denotes volume in cc.)

To this mixture 1 cc. of the bacterial suspension was added and after the lapse of one hour the whole was diluted to ten thou-

sand times and in 0.04 cc. of this diluted solution the surviving bacteria were counted as usual. The results are given in Table VI.

TABLE VI.

No. of test tube. Bacteria	Colonies							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Bact. coil communis.	140	123	138	119	172	92	136	51
	253	128	168	123	223	203	215	64
	49	42	44	12	47	8	27	7
	112	88	85	82	90	80	80	64
Staphylococcus aureus.	188	166	180	106	162	108	137	81
B. proteus.	264	198	182	79	185	116	107	54
	123	114	124	113	123	95	117	73
B. prodigiosus.	16	12	14	11	17	12	12	5
B. mesentericus.	20	8	13	4	13	10	8	1
	37	29	27	15	21	27	20	9
B. pyocyaneus.	64	17	2	0	131	18	1	0

Similar experiments were repeated with o-, m- and p-cresol. The composition of the mixture was quite the same except that a M/10 cresol solution was used instead of the phenol. The results are tabulated in Table VII.

From the foregoing experiments, it is clear that phenols exhibit the strongest bactericidal power in cooperation with peroxidase and hydrogen peroxide. Of course each constituent of the mixture exerts its own bactericidal action. But in all of the experiments the mixture (VIII) showed distinguished behavior, which is more than the arithmetical sum of the activities of each constituent. It is perceptible, owing to the development of brown or yellowish-white colour, that the phenols undergo a profound chemical change by means of the peroxidase and hydrogen peroxide. Perhaps quinone was produced as Szent-Györgyi (1928) pictured.

TABLE VII.

No. of test tube 3-cresols		Colonies.							
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
a.	O	49	31	44	5	47	49	27	3
	M	"	4	"	4	"	14	"	0
	P	"	30	"	5	"	47	"	0
b.	O	112	107	85	78	90	108	84	51
	M	"	81	"	55	"	80	"	14
	P	"	87	"	70	"	102	"	0
c.	O	499	403	422	246	430	328	366	106
	M	"	288	"	142	"	243	"	52
	P	"	386	"	233	"	315	"	20

According to the author's experiment, quinone showed a complete bactericidal power in so small a concentration as M/1280. Therefore, the development of a minute trace of this substance from phenol may well explain the accentuation of the bactericidal power of phenol in co-operation with peroxidase system.

Another fact which supports the quinone theory is that the increase in the bactericidal power of phenol is of transitory nature as is shown in the next experiment. To the mixture of phosphate buffer, distilled water, phenol and hydrogen peroxide, as given in Table V, in one test tube there was added the bacterial suspension and then followed by peroxidase solution. In another tube, to the same mixture as above the peroxidase solution was added at first and the whole was put aside for thirty minutes, and then the bacterial suspension was added. The results are indicated in Table VIII.

In comparing the colonies of surviving coli as usual we are lead to conclude that the bactericidal power is far more apparent in the case of fresh mixture. This can be explained only by assuming that the substance responsible for germicidal action is quinone

TABLE VIII.

No. of test tube. Addition of the peroxidase solution:	Colonies.							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Immediately,					174	103	88	2
Later, (after the lapse of 30 minutes.)	140	123	138	119	172	92	136	51
Immediately,					185	142	180	2
Later,	253	128	168	123	223	203	215	64

which is a very labile compound in aqueous solution. The preceding communication also gives the full support in this connection.

CONCLUSIONS.

1. The precipitation of protein by phenols at the pH corresponding to the intracellular alkalinity can not be caused by such a concentration of phenols as sufficient for bactericidal action. It was suggested, therefore, that the coagulation of protoplasm-protein, as usually assumed, is not solely responsible for it.

2. Evidence was given that, in the presence of oxygen, the bactericidal power of phenols is more pronounced than in its absence.

3. Peroxidase and H_2O_2 , when acted upon phenols, give a substance of highly germicidal power.

4. Owing to the high oxidation potential and to the transitory nature in the aqueous solution, the substance is assumed to be quinone, which possesses a powerful germicidal action.

5. Various bacteria showed the different resistance toward some oxidising agents such as $KMnO_4$ or H_2O_2 . The similar difference was also perceived against phenols in the presence of oxygen.

6. An idea was put forward, as an explanation for the role

of oxygen, that oxygen may give rise to H_2O_2 as was proved by Wieland and this, in conjunction with peroxidase present in bacteria, gives a quinone which acts as a bactericide.

I wish to express my best thanks to Professor Dr. K. Kodama for his kind help and advice.

REFERENCES.

- Beechold (1922): Die Colloidchemie im Biologie u. Medizin. IV. Aufl. S. 431.
- Cooper and Woodhaus (1923): Biochem. J., **17**, 611.
- Cooper and Mason (1928): J. path. and Bakteriology, **31**, 343.
- Callow (1926): Biochem. J., **20**, 247.
- Furuta (1902): Chem. Zentralblatt, **2**, 385.
- Herzog and Betzel (1919-1911): Zeitschr. f. Physiol. Chemie., **67**, 309, **74**, 221.
- Happold and Raper (1925): Biochem. J., **19**, 92.
- Kuroda (1926): Bioch. Zeitschr., **169**, 281.
- McLeod Gordon and Pyrah (1922-1923) J. Path. and Bact., **26**, 127.
- McLeod and Gordon (1922): Biochem. J., **16**, 499.
- Reichel (1909): Biochem. Zeitschr., **22**, 149-231.
- Raper (1927): Biochem. J., **2**, 89, 1370.
- Schubert and Richter (1925): Zentralblatt f. Bakt. Parasit u Infektionskrh. II Abtg., **66**, 11.
- Scott (1928): J. infekt. Diseases., **43**, 90.
- Stapp (1924): Zentralblatt f. Bakt. Parasit. u. Infektionskrh. I Abtg., **92**, 161.
- Szent-Györgyi (1928): Biochem. J., **22**, 1401.
- W. A. Hagan (1924): J. Infekt. Diseases., **35**, 390.

DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DEN EIWEISSTOFFWECHSEL.

I. Die Stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Sommerzeit.

VON

SIGETOSI SIBUYA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 17. April 1931)

Die chemische Reaktion wird durch Temperaturerhöhung beschleunigt, durch Abkühlung verlangsamt. Diese Regeln gelten bei Tieren jedoch nicht immer. Schon im Jahre 1877 hat Lavoisier den Einfluss der Aussentemperatur auf den Stoffumsatz des Menschen gezeigt. Bei sinkender Temperatur wird mehr verbrannt, und bei steigender Aussentemperatur ist das Gegenteil der Fall. Bei höherer Temperatur ist eine Grenze gegeben, bei der nach der anfänglichen Senkung wieder eine Steigerung einsetzt. Es ist ferner eine Tatsache, dass die Temperaturunterschiede im homoisothermen Organismus nicht eine einfache chemische Reaktion beeinflussen, sondern auf einen differenzierten Regulationsmechanismus einwirken müssen. Durch die Untersuchungen vieler Autoren, wie O'Conner (1919), Bergmann (1912), Gessler (1925), Freund und Jansen (1923), Freund und Grafe (1912) und Isenschmid und Krehl (1912) ist bekannt geworden, dass der Organismus durch physikalische und chemische Wärmeregulation, die beide einen eng aneinander gekoppelten Regulationsmechanismus darstellen, seine eigene Wärme konstant erhalten kann. Kommt es daher zu einer Störung dieser Regulationsvorgänge, so kann eine vermehrte Wärmeabgabe oder eine Wärmerstauung die Folge sein. Bei niedriger Aussentemperatur ist die Wärmeregulation aufs äusserste angespannt. Wird durch die

maximale Anspannung die Leistung des Organismus überspannt, so findet ein plötzliches Absinken des Stoffwechsels statt, wie Rubner gezeigt hat. Das umgekehrte Verhalten zeigt der Stoffwechsel, wenn bei steigender Aussentemperatur, trotz maximaler Anspannung, eine Wärmestauung auftritt, deren Folge eine Steigerung des Stoffwechsels ist, wie bei echtem Fieber. Schon May (1894), Nebeltau (1894) und Staehelin (1907) haben bewiesen, dass bei Tieren experimentell erzeugtes Fieber mit einer Stoffwechselsteigerung einhergeht. Müller (1903), Kraus (1906) und Kocher (1914) haben ebenfalls experimentell bewiesen, dass im Fieber der Eiweissumsatz erhöht, und infolge der mangelhaften Glykogenfixation in der Leber der Eiweissbedarf gesteigert wird, den das Körpereiwiss bestreitet. Im allgemeinen ist der Eiweissabbau um so stärker, je höher das Fieber während der Krankheit auftritt. Trotz des erhöhten Eiweissabbaues lässt sich auch im Fieber das Stickstoffgleichgewicht erzielen, wenn sehr grosse Mengen Kohlehydrate gegeben werden. Inada (1929) hat die chemische Zusammensetzung der Leber bei künstlichem Fieber untersucht und gefunden, dass die chemische Veränderung der Organe bei der durch künstliche Übererhitzung erzeugten Hyperthermie anders ausfällt als bei infektiösem Fieber, was darauf hindeutet, dass der durch die Temperatursteigerung hervorgerufene chemische Vorgang in beiden Fällen nicht ganz der gleiche ist.

Es ist eine charakteristische Erscheinung, dass die einen Winterschlaf haltenden Tiere eine schlechte entwickelte Wärmeregulation haben. Da diese Tiere sich fast ausschliesslich von Insekten und Vegetabilien nähren, müssten sie im Winter bei vermindertem Umsatz verhungern. Der Winterschlaf ist also eine ausserordentlich zweckmässige Anpassung an die äusseren Lebensverhältnisse. Es ist schon bekannt, dass die Temperatur des tief-schlafenden Tieres im wesentlichen von der Aussentemperatur abhängig und im Gegensatz dazu im Sommer beim Erwachen sehr labil ist. Wenn ein Winterschläfer aus irgendeinem Grund erwacht, so steigt seine Temperatur sehr schnell. Daher wird das Tier

warm, weil es erwacht, wie Merzbacher (1904) betont hat. Nach Adler (1926) steht das Wesen des Winterschlafes mit der Funktion der innersekretorischen Organe, bzw. der Schilddrüse, in innigem Zusammenhang.

Die Schilddrüse funktioniert schwächer und stoffsparend, wenn die Temperatur ansteigt. Dagegen lässt bei kalter Aussentemperatur eine stärker funktionierende Schilddrüse den Stoffzerfall zunehmen. Nach der experimentellen Untersuchung von Iino übt die kalte (im Sommer) oder die warme (im Winterschlaf) Aussentemperatur auf den Adrenalingehalt in der Nebenniere und den Glykogengehalt der Leber so gut wie keinen Einfluss aus.

Imamura hat im Jahre 1922 den Kohlehydrat- und Fettstoffwechsel der Kröte sowohl in der Winterschlafzeit als auch in der Zeit des Wachseins genauer untersucht. Nach ihm ist der Glykogen- und Fettgehalt im Sommer viel geringer als im Winter, dagegen zeigt der Blutzuckergehalt gerade die umgekehrten Verhältnisse. Die Vermehrung des Glykogengehaltes beim Winterschlaf wie auch in der Laichzeit beruht allgemein auf der Glykogenbildung aus Eiweiss. Dagegen findet diese Glykogenablagerung in der Leber ausser während des Winterschlafes in einer anderen Jahreszeit nicht statt, auch wenn man die Kröte in einem Eisschrank bei derselben Temperatur wie im Winter hungern lässt. Das beim Winterschlaf reichlich abgelagerte Fett wird auch im Stadium des Nahrungsmangels allgemein aus Glykogen umgebildet und dient als Hauptbrennmaterial.

Die Autolyse in der Leber wurde zuerst von Salkowski beobachtet. Es ist gegenwärtig nicht möglich zu sagen, in wieweit auch in der Leber unter physiologischen Verhältnissen autolytische Vorgänge stattfinden. Wenn wir also augenblicklich auch die Bedeutung der bei der Autolyse wirksamen Enzyme für die physiologischen Verhältnisse nicht beurteilen können, so widerspricht dies doch nicht der herrschenden Anschauung, dass im normalen Zellenleben Enzyme eine äusserst wichtige Rolle spielen. Man neigt wohl immer mehr zu der Ansicht, dass die chemischen Um-

setzungen in den lebenden Zellen durch Enzyme ausgelöst werden, und dass die letzteren als chemische Werkzeuge der Zellen zu betrachten sind. Für die Wirkung solcher Enzyme unter pathologischen Verhältnissen hat Jacoby (1900) schon bei der akuten Phosphorvergiftung und der akuten gelben Leberatrophie enzymatische Abbauprodukte des Eiweisses im Harn beobachtet.

Eine Auflösung des proteolytischen Systems in den tierischen Organen, Leber, Milz, und in den Leukozyten, haben zuerst Hedin (1901, 1904, 1906/7, 1922, 1930), dann Willstätter (1928/29), Waldschmitzleitz (1927/29, 1930), Grassmann (1928) und ihre Mitarbeiter nach den Einzelkomponenten mit Hilfe von Adsorptionsmitteln angestrebt. Nach ihnen lassen sich alle diese Organ- und Gewebsproteasen auf vier Enzyme, eine im sauren Gebiet wirkende Proteinase: Kathepsin, Carboxypolypeptidase, und eine andere im alkalischen Gebiet wirkende Peptidase: Aminopolypeptidase, Dipeptidase, zurückführen. Willstätter vermutet, dass diese beiden Enzyme mit den Proteasen der Leukozyten identisch seien.

Wenn die chemischen Umsetzungen in den lebenden Zellen durch solche Enzyme ausgelöst werden, müssen die verschiedenen Eiweissabbauprodukte in Organen und Geweben in Vivo enthalten sein, obwohl sie natürlich durch Autolyse nach dem Tode des Organs auftreten und im Organextrakte als dessen Bestandteile gefunden werden dürften.

Die Frage der extraktiven Stoffe der Leber wurde von vielen Autoren untersucht. Das Cystin wurde zuerst von Drechsel (1891) aus Delphin- und Rinderleber, von Scherer (1902) aus der Leber eines an Typhus verstorbenen Menschen und von Offer (1906) aus Pferdeleber gefunden. Leucin wurde von Gorup-Besanez (1856) aus Kalbsleber isoliert. Seit Städeler (1858) wurde das Taurin als ein Komponent der gepaarten Gallensäure von vielen Autoren in der Leber bestätigt. Unter den Purinbasen wurden Adenin und Guanin von Smorodinzew (1912) aus Ochsenleber und von Hiwatari (1927) aus Rinderleber, Xanthin

und Hypoxanthin von Scherer (1859), Almen (1866) aus Ochsenleber und von Hiwatari (1927) aus Rinderleber gefunden. Das Purinderivat Harnsäure wurde von Cloëtta (1856), Scherer (1859) und Schröder (1887) aus Ochsenleber erhalten.

Fast alle Aminosäuren sind Substituenten des Alanins, und dieses Alanin kann bekanntlich über Brenztraubensäure und Milchsäure in Zucker übergehen. Ringer und Lusk (1910) fanden am hungernden Phlorrhizinhund, dass Glykokoll und Alanin quantitativ mit ihrem ganzen Kohlenstoffbestand in Zucker übergingen. Sie fanden ferner bei Eingabe von 20 g Asparaginsäure 12.24 g Extrazucker und stellten einen ähnlichen Befund auch für die Glutaminsäure fest.

Somit scheint das Glykogen der Krötenleber beim Winterschlaf aus Eiweiss und das Hauptbrennmaterial Fett aus dem Glykogen gebildet zu werden. Dieses Brennmaterial wird im Sommer ausschliesslich durch Insekten und Vegetabilien geliefert. In diesem Sinne muss der Eiweisstoffwechsel der Leber in der Winterschlafzeit und in der Zeit des Wachseins verschieden sein, wenn der Eiweissabbau in Organen und Geweben durch die Proteasen ausgelöst wird. Ob der Eiweissabbau auch durch die Höhe der Temperatur selbst gefördert wird, ist eine Frage, die man durch Übererhitzung von Menschen und Tieren zu lösen versucht hat. Die Untersuchungen hatten aber so widersprechende Ergebnisse, dass es nicht möglich ist, zu einem klaren Urteil zu kommen.

Auf Grund der oben aufgeführten Daten und Erwägungen habe ich zuerst die stickstoffhaltigen extraktiven Stoffe der Krötenleber im Sommer untersucht, einerseits um zu sehen, wieweit der Eiweisstoffwechsel der Leber durch Steigerung der Aussentemperatur beeinflusst wird, andererseits um einen genaueren Einblick in das Wesen der chemischen Wärmebildung (Fieber) zu erhalten.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Im Sommer (Aussentemperatur 27–30°C) wurde Kröten

die Leber, insgesamt 9 kg, entnommen. Diese frischen normalen Lebern wurden schnell mit Wasser gewaschen, um sie vom Blut zu befreien; die Häute wurden mittels Pinzette entfernt. Dann wurden die Lebern mit einer Hackmaschine zu einer breiigen Masse zerhackt, mit der dreifachen Menge Wasser versetzt und gut durchgerührt. Das Gemisch wurde eine Stunde lang auf dem Wasserbade bei 37–40°C digeriert. Die Flüssigkeit wurde nun kolfiert, und der Rückstand noch dreimal in genau der gleichen Weise mit Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserauszüge wurden zunächst, um das Eiweiss zu fällen, mit einer 20%igen Tanninlösung versetzt, bis keine Fällung mehr entstand, und von der Fällung abfiltriert. Das Filtrat wurde von überschüssigem Tannin durch Bleiessig, von überschüssigem Blei durch Schwefelwasserstoff befreit. Die von fällbarem Eiweiss befreite Flüssigkeit wurde im Vakuum unter 40°C bis zur eintretenden Kristallisation eingeengt. Lässt man die eingeengte Flüssigkeit im Eisschrank genügend lange stehen, so scheiden sich büschelförmige, seidig glänzende Nadelkristalle aus, deren Gewicht hier 4.3105 g betrug. Der Kristall zeigte deutlich Millon's und Piria's Reaktion. Er wurde in verdünntem Ammoniak gelöst und wieder mit verdünnter Salzsäure ausgefällt.

Die aus heissem Wasser gereinigten Kristalle erwiesen sich auf Grund des folgenden Analysenwertes nach Kjeldahl als Tyrosin.

0.0552 g Substanz verbrauchten 3.20 ccm N/10 H₂SO₄.

Ber. f. C₉H₁₁NO₃: 8.18%N; gef. 8.11%N.

Die salzsaure Lösung dieser Kristalle drehte das polarisierte Licht nach links.

$$[\alpha]_D^{20} = -15.1^\circ$$

Die vom Tyrosin abfiltrierte Lösung wurde mit Äther 72 Stunden lang im Kumakawa-Suto'schen Extraktionsapparate extrahiert, um das Fett zu entfernen. Zur Gewinnung der Milchsäure wurde sie wieder bei stark schwefelsaurer Reaktion in der gleichen Weise behandelt. Die von Fett und Milchsäure befreite Lösung wurde

so stark mit H_2SO_4 angesäuert, dass sie 5% davon enthielt; dann wurde sie mit 20%iger Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt. Die Fällung wurde als Basenfraction, das Filtrat davon als Aminosäurefraction bezeichnet.

Aminosäurefraction.

Für die Isolierung der Monoaminosäure wurde nach der von E. Fischer (1901) angegebenen Methode verestert. Die in Freiheit gesetzten Ester wurden der fraktionierten Destillation unterworfen.

1. Fraction bis 60°C des Wasserbades und 10 mm Druck . . . 0.03 g.
2. " " 100°C " " " 10 " . . . 0.60 g.
3. " " 100°C " " " 6 " . . . 0.26 g.

Jede Fraction wurde in der bekannten Weise verseift. Die Trennung der einzelnen Aminosäuren wurde durch ihre verschiedene Löslichkeit bzw. durch die ihrer Kupfersalze ausgeführt, und alle isolierten Aminosäuren wurden als solche oder als Kupfersalz analysiert.

Analyse:

- 1) *l-Leucinkupfer* (0.0800 g)

0.0306 g Substanz gaben 0.0076 g CuO .

Ber. f. $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2)_2\text{Cu}$ 19.63% Cu; gef. 19.52% Cu.

- 2) *Isoleucinkupfer* (0.0210 g)

Die wässrige Lösung dieser freien Aminosäure drehte das polarisierte Licht nach rechts.

0.0164 g Substanz gaben 0.0040 g CuO .

Ber. f. $(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{NO}_2)_2\text{Cu}$ 19.63% Cu; gef. 19.48% Cu.

- 3) *dl-Valinkupfer* (0.0015 g)

- 4) *l-Prolinkupfer* (0.0315 g)

Die wässrige Lösung der freien Aminosäure drehte das polarisierte Licht nach links.

0.0241 g Substanz ergaben 0.065 g CuO .

Ber. f. $(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_2)_2\text{Cu}$ 21.79% Cu; gef. 21.55% Cu.

5) *dl*-Prolinkupfer (0.0714 g)

0.0365 g Substanz gaben 0.0992 g Cu.

Ber. f. $(C_5H_9NO_2)_2Cu$ 21.79% Cu; gef. 21.71% Cu.*Basenfraktion.*

Die Trennung der Purinbasen wurde nach der Methode von Kutscher ausgeführt, und zwar wurde die Phosphorwolframsäurefällung durch Baryt zerlegt und als Silbernitratverbindungen ausgefällt. Aus dieser Purinbasenfällung wurden die einzelnen Purinbasen nach dem aus der Methode von Kossel (1882/84) und Krüger (1899/1902) begründeten Verfahren von Schimizu (1921) isoliert. Die von der Purinbasenfällung abfiltrierte Lösung muss Hexonbasen enthalten. Die Arbeit darüber wird fortgesetzt.

Die Gesamtmenge der Aminosäuren und Purinbasen, die aus 9 kg frischer normaler Krötenleber, im Sommer entnommen, herkommen, betrug:

Glykokoll	—	—
Alanin	wenig vorhanden.	—
<i>d</i> -Valin	0.0012 g	—
<i>l</i> -Leucin	0.0643 g	0.007%
Isoleucin	0.0169 g	0.002%
<i>l</i> -Prolin	0.0246 g	0.002%
<i>dl</i> -Prolin	0.0558 g	0.006%
<i>l</i> -Tyrosin	4.3100 g	0.477%
Guanin	0.0648 g	0.007%
Adenin	0.3536 g	0.039%
Xanthin	0.1071 g	0.012%
Hypoxanthin	0.1244 g	0.013%

Es ist bemerkenswert, dass das Tyrosin in der im Sommer entnommenen Krötenleber in quantitativer Hinsicht bedeutend mehr wiegt als andere Aminosäuren, während im Winterschlaf das Leucin vorherrscht, wie von Makino (1931) bewiesen wurde.

Abderhalden (1913, 1922) hat durch seine Experimente

gezeigt, dass das Tyrosin ein unbedingt notwendiger Bestandteil der vollkommenen Nahrung ist, weil das hydrolysierte Kasein, von dem das Tyrosin entfernt wurde, nicht ausreicht, das Körpergewicht des Hundes konstant zu halten. Dagegen hat Totani (1916) bei der Ratte beobachtet, dass trotz der Entfernung des Tyrosins aus dem hydrolysierten Kasein des Tier sich ziemlich gut entwickelte, und dass das hydrolysierte Gelatin, das eine minimale Menge von Tyrosin enthält, eine kurze Zeit für das Wachstum der Ratte ausreichte, und sich das Wachstum des Tieres durch Zusatz von Tyrosin nicht verbesserte.

Die Kröte ist mit pigmentreicher Haut bedeckt. Daher ist viel Muttersubstanz in der Sommerzeit in der der Eiweisstoffwechsel gesteigert wird, notwendig. Es ist eine bekannte Tatsache, dass das Tyrosin durch die Tyrosinase von Bertrand in eine dem Melanin ähnliche Substanz umgewandelt wird, und dass dieser Vorgang sowohl im Pflanzenreich, als auch im Tierorganismus vor sich geht. Die Melanin ähnliche Substanz aus Tyrosin durch Tyrosinase wird nach den Untersuchungen von Onslow (1925) und Raper (1926/27) über Dioxyphenylalanin gebildet. Das Adrenalin aus der Nebenniere, das den Kohlehydratstoffwechsel beeinflusst, ist als ein Derivat aus Tyrosin zu betrachten. In der Tat hat Halle (1906) beobachtet, dass der Adrenalingehalt der Nebenniere sich vermehrt, wenn die Nebenniere mit Tyrosin bebrütet wird. Bloch (1917) und Bloch u. Schaaf (1925) haben bewiesen, dass das Dioxyphenylalanin für die Pigmentbildung durch Dopaoxydase in der Haut eine einzige Substanz ist. Dieses Ferment wirkt nicht auf Tyrosin.

Tyroxin aus Schilddrüse von Kendall (1915), Harrington und Barger (1927) steht chemisch konstitutionell mit Tyrosin in innigem Zusammenhang. Das Tyroxin veranlasst nach Boothby u. Sandiford (1923) bei intravenöser Zufuhr beim Hunde Wärmebildung. Nach Romeis (1922) wird die Entwicklung der Froschlärve durch Tyroxin deutlich gefördert.

Somit ist nach den oben angeführten Tatsachen wohl denkbar,

dass das Tyrosin mit der Hormonbildung im Organismus einen innigen Zusammenhang haben dürfte, und dass die Hormonbildung aus Tyrosin nach Bedarf im Sommerleben der Kröten gesteigert wird, was eine vermehrte Spaltung des Tyrosins in der Leber zur Folge hat. Andererseits muss man auch berücksichtigen, dass die Aminosäuren im Sinne der chemischen Wärmebildung eine spezifische dynamische Wirkung auf den Stoffwechsel ausüben, wie Lusk (1915, 1918) und Herzog u. Saladin (1912) beobachtet haben.

Nach Ringer u. Lusk (1910), Dakin (1923) und Mann u. Magath (1922/23) wird aus einigen Aminosäuren die Glukose im Organismus gebildet. Dakin hat beobachtet, dass unter den cyklischen Aminosäuren nur das Prolin in Zucker verwandelt wird. In diesem Sinne scheint die Menge des Prolins im Leberextrakt der Kröten im Sommer verhältnismässig vermehrt zu sein. Da Fette aus Kohlehydraten entstehen können, und da ferner eine Kohlehydratbildung aus Eiweiss erwiesen ist, kann selbst die Möglichkeit einer indirekten Fettbildung aus Eiweiss, bzw. aus Aminosäuren, mit einem Kohlehydrate als Zwischenstufe verständlich sein.

Die Brennmaterialien Fett oder Kohlehydrate scheinen somit aus Aminosäure bzw. Leucin in der Krötenleber während der Sommerzeit gebildet zu werden, was im Leberextrakt eine reichlichere Menge Leucin zur Folge hat. Schon R. Cohn (1899) hat beobachtet, dass in der Kaninchenleber aus Leucin Glykogen gebildet wird. Im Gegensatz zu ihm konnte Simon (1902) nach Verabreichung von Leucin in keinem Falle Glykogen in der Leber auffinden.

Man kann also wohl kurz sagen, dass die Brennmaterialien Fett wie Kohlehydrate aus Eiweissbestandteilen gebildet werden, wenn das Fett oder Kohlehydrat bei höherer Aussentemperatur grösstenteils verbraucht wird, weil sich die Kröten in der Sommerzeit nur von Insekten und Vegetabilien nähren, die arm an Kohlehydrat sind. In diesem Sinne muss der Eiweissstoffwechsel der Krötenleber bei höherer Aussentemperatur gesteigert werden,

dessen Folge dann der steigende Gehalt der Spaltungsprodukte des Eiweiss im Leberextrakt sind, die für die Bildung von Brennstoffen benutzt werden könnten.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. (1913): Zeitschr. f. physiol. Chem., **83**, 444.
 „ (1922): Arch. ges. Physiol. **195**, 199.
 Adler, E. (1926): Handbuch d. norm. u. pathol. Physiol. **17**, 116.
 Almen, A. (1836): JI. f. prakt. Chem. **96**, 98.
 Bergman v. G. u. M. Castex (1912): Schmiedberg, Arch. **10**, 1.
 Bloch, B. (1917): Zeitschr. f. physiol. Chem. **98**, 226.
 „ u. Schaaf, F. (1925): Bioch. Zeitschr. **162**, 181.
 Boothby, W. U. u. Sandiford, I. (1923): Proc. Amer. Soc. Biol. Chem. **6**, 40.
 Cloëtta, A. (1856): Ann. d. Chem. **99**, 289.
 Cohn, R. (1899): Zeitschr. f. physiol. Chem. **28**, 211.
 Drechsel, E. (1891): Arch. f. Anat. u. Physiol. 243.
 „ (1896): Z. f. Biol. **33**, 85.
 Dakin, H. D. (1923): JI. Biol. Chem. **56**, 43.
 Fischer, E. (1901): Zeitschr. f. physiol. Chem. **33**, 151.
 Freund, H. u. S. Jansen (1923): Pfüger's Arch. **200**, 93.
 „ u. E. Grafe (1912): „ „ **70**, 135.
 Grassmann, W. u. H. Dyckerhoff (1928): Zeitschr. f. physiol. Chem. **179**, 41.
 Gessler, H. (1925): Pfüger's Arch. **207**, 370, u. 390.
 Von Gorup-Besanez, E. F. (1856): Ann. d. Chem. **98**, 1.
 Hedin, S. G. u. S. Rowland (1901): Zeitschr. f. physiol. Chem. **32**, 341, 531.
 Hedin, S. G. u. S. Rowland (1904): JI. of physiol. **30**, 155.
 „ (1906/7): Bioch. JI. **2**, 112.
 „ (1922): JI. of biol. Chem. **54**, 177.
 Hedin, S. G. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 261.
 Hiwatari, Y. (1927): JI. of Bioch. **7**, 161.
 Halle, W. L. (1903): Hofmeister's Beiträge **8**, 276.
 Harrington, C. R. u. Barger, G. (1927): Bioch. JI. **21**, 169.
 Herzog, R. O. u. O. Saladin (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem. **73**, 302.
 Iino, Y. (1929): Mitteil. Med. Akad. Kyoto. **4**, 31.
 Imamura, A. (1922): Mitteil. a. med. Fak. Tokyo. **28**, 1.
 Inada, J. (1929): Tokyo Igakkai Zasshi. **43**, 564.
 Isenschmid, R. u. L. Krehl, (1912): Pfüger's Arch. **70**, 109.
 Jacoby, M. (1900): Zeitschr. f. physiol. Chem. **30**, 174.

- Kraus, F. (1906): Norden Handbuch der Pathologie des Stoffwechsels. 1, 578, 2. Aufl.
- Kocher, R. A. (1914): Deutsch. Arch. Klin. Med. **115**, 82.
- Kossel, A. (1882): Zeitschr. f. physiol. Chem. **6**, 422.
- „ (1884): „ **8**, 404.
- Krüger, M. u. G. Salmon (1899): Zeitschr. f. physiol. Chem. **26**, 350.
- Krüger, M. u. A. Schittenhelm (1902): Zeitschr. f. physiol. Chem. **35**, 153.
- Kendall, E. C. (1915): Jl. Amer. Ked. Assoc. **44**, 2042.
- Lavoisier, M. (1877): Pflüger's Arch. **14**, 73.
- Lusk, G. (1915): Jl. of biol. Chem. **20**, 555.
- May, R. (1894): Zeitschr. f. Biol. **30**, 1.
- Müller, Fr. (1903): Handbuch der Ernährungslehre **2**, 213.
- Merzbacher, (1904): Erg. d. Physiol. **3** II, 214.
- Mann, F. C. u. Magath, T. B. (1922): Arch. intern. Med. **30**, 73 u. 171.
- Nebeltau, E. (1894): Zeitschr. f. Biol. **31**, 293.
- O'Connor, J. M. (1919): Jl. Physiol. **52**, 267.
- Offer, Th. R. (1906): Hofmeisters Beiträge. **8**, 400.
- Onslow, M. W. u. Robinson, M. E. (1925): Bioch. Jl. **19**, 420.
- Ringer, A. J. u. Lusk, G. (1910): Zeitschr. f. physiol. Chem. **66**, 106.
- Reper, H. S. (1926): Bioch. Jl. **20**, 735.
- „ (1927): „ **21**, 89.
- Romeis, B. (1922): Klin. Wschr. Jg. I. 1262.
- Staehelein, R. (1907): Arch. f. Hyg. **50**, 77.
- Städeler, G. u. Frerichs, F. Th. (1858): Jl. f. prakt. Chem. **73**, 46.
- Von Scherer, J. Zit. nach E. Friedmann (1902): Erg. d. Physiol. **1**, 15.
- Smorodinzew, J. (1912): Zeitschr. f. physiol. Chem. **80**, 218.
- V. Scherer, J. (1859): Ann. d. Chem. **107**, 314.
- Schröder, (1887): Maly's Jahresber. **17**, 148.
- Schimizu, T. (1921): Bioch. Zeitschr. **117**, 252.
- Simon, O. (1902): Zeitschr. f. physiol. Chemie. **35**, 315.
- Totani, G. (1916): Bioch. Jl. **10**, 382.
- Willstätter, R. u. E. Bamann (1928/29): Zeitschr. f. physiol. Chem. **180**, 127.
- Willstätter, R. u. E. Bamann u. U. Rohdewald (1929): Zeitschr. f. physiol. Chem. **185**, 267.
- Waldschmitzleitz, E. u. Deutsch, W. (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem. **167**, 285.
- Waldschmitzleitz, E. u. A. Purr (1929): Ber. d. dtsh. Chem. Ges. **62**, 2217.
- Waldschmitzleitz, E. Schäffer, A. u. Beck, J. J. u. Blum, E. (1930): Zeitschr. f. physiol. Chem. **188**, 17.

BEDEUTUNG DER GALLENSÄURE IM KOHLE- HYDRATSTOFFWECHSEL. XI.

Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese
und Spaltung der Hexosephosphorsäure in der
Leber, der Niere und im Muskel.

VON

ZIRO URAKI.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 20. April 1931)

Im Jahre 1905 haben Harden und Young beobachtet, dass eine Zugabe von Phosphorsäure die Hefegärung beschleunigt, und dass die Hexosediphosphorsäure „Zymophosphat“ ein integrierender Bestandteil der alkoholischen Gärung ist, der während des Gährungsprozesses sich bildet und in späterem Stadium wieder zerfällt. Neuerdings wurde durch die Untersuchung von Robison (1922) Hexosemonophosphorsäure auch bei der Gärung beobachtet. Bezüglich des Mechanismus der alkoholischen Hefegärung wird von vielen Autoren angenommen, dass das Zuckermolekül zunächst aus der gewöhnlichen in die sogenannte Enolform übergeht, und dass diese sich unter Einwirkung eines Enzymes, der sog. Phosphatase, mit Phosphorsäure zu einer sog. Hexosediphosphorsäure verbindet.

Nun haben Embden, Griesbach und Schmitz (1914) beobachtet, dass bei kurzen Aufbewahren des Muskelpressaftes von Hunden annähernd äquimolekulare Mengen von Phosphorsäure und Milchsäure entstehen, und dass diese Milchsäure- und Phosphorsäurebildung durch Zusatz von Hexosediphosphorsäure vermehrt wird. Auf Grund ihrer Befunde haben sie den Schluss gezogen, dass in einem frühen Stadium des anaeroben Kohlehydratabbaues im tierischen Organismus eine Synthese der Kohlehydrate mit Phosphorsäure erfolge, und dass diese Synthese ein notwendiges Zwischenglied in der Reihe der zur Milchsäurebildung

aus Zucker führenden Vorgänge sei.

Schon früher haben Embden, Kaberlah und Engel (1912) für die Milchsäurevorstufe des Muskels die Bezeichnung „Laktacidogen“ gewählt und angenommen, dass die Milchsäurevorstufe eine Hexosediphosphorsäure sei.

Bei den ausgedehnten Untersuchungen von Embden und Laqueur (1917, 1921), Embden und Lehnartz (1924) und Embden u. Zimmermann (1925, 1927), Embden, Jost u. Lehnartz (1930) wurden aus frischer Muskulatur des Hundes Hexosemonophosphorsäure und Hexosediphosphorsäure gewonnen, die mit der von Young (1911) und Harden u. Young (1905) identisch sind. Nach den Untersuchungen dieser Autoren ist der Diphosphorsäureester eine Stabilisierungsform. Nach Meyerhof (1926/27) bildet sich beim Abbau des Zuckers zuerst ein Hexosemonophosphorsäureester. Ob dieser Ester freilich in der Struktur seiner Hexose dem Neubergschen (1918) Fruktosemonophosphorsäureester oder dem Robisonschen (1923) Glukosemonophosphorsäureester entspricht, ist noch nicht entschieden.

Die Untersuchungen vieler Autoren, wie die von Embden (1921), Neuberg u. Gottschalk (1926) und Oppenheimer (1912), liessen vermuten, dass beim intracellulären Abbau von Glykogen eine besondere reagible Modifikation der Glukose entstehe, und dass die vorherige Polymerisation zu Glykogen Vorbedingung für die Verwertung des Zuckers im Organismus sei. Auch müsse eine Umwandlung der Glukose in eine reagible Form der Überführung in Glykogen vorausgehen. So hat sich denn die Anschauung von einer besonderen Reaktionsform der Glukose entwickelt, in die Traubenzucker oder Glykogen umgewandelt werden müssen, bevor sie im Organismus verwertet werden können. Über die Natur dieser Reaktionsform sind verschiedene Ansichten geäußert worden.

Bekanntlich findet als vorbereitende Reaktion für den Abbau des Zuckers stets eine Veresterung mit Phosphorsäure statt. Der Diphosphorsäureester der gärfähigen Hexosen konnte nach

Harden u. Young (1911) als Fruktosephosphorsäureester aufgefasst werden. Auch hat Lebedew (1911) sich für die Annahme der Ketostruktur ausgesprochen. Nach den neuesten Untersuchungen von Meyerhof u. Lohmann (1927/28) ist in jedem Ester auch ein Anteil des anderen stereoisomeren Zuckers enthalten, sodass im Neubergschen Ester nur die Ketokomponente überwiegt, im Robisonischen und Embdenschen Monoester die Aldokomponente.

Nach Harden und Young (1908), Euler u. Ohlsén (1911), und Euler, Ohlsén u. Johansson (1917) besteht zwischen Glukose und Fruktose insofern ein wesentlicher Unterschied, als Glukose ohne Vorbehandlung mit lebender Hefe keine Phosphatbindung durch den Extrakt der Hefe erfährt, während bei der Fruktose die Veresterung mit Phosphorsäure ohne Angärung eintritt, und die Hexose im Zymophosphat die Konfiguration der Fruktose besitzt. Die Glukose soll also vor der Veresterung in Fruktose oder in eine der Fruktose ähnliche Reaktionsform umgewandelt werden.

Andererseits haben Embden, Kraus und Oppenheimer (1912) beobachtet, dass bei Durchblutung der glykogenfreien Leber unter Zusatz von Traubenzucker oder Fruchtzucker eine Steigerung der Milchsäurebildung stattfindet, und dass diese Milchsäurebildung aus Fruktose ungleich stärker ist als die aus Glukose. Nach Brugsch (1926) geht die Phosphorylierung der Glukose zur d-Fruktosediphosphorsäure in der Art vor sich, dass aus einem rechtsdrehenden Zucker, der Glukose, durch Aufspaltung in Milchsäure und Bindung an die Phosphorsäure ein linksdrehender sterisch veränderter Zucker wird, der für den Organismus erst verwertbar wird. Brugsch hält diesen Zucker für eine γ -Glukose von E. Fischer, die nicht stabil ist. Bleyer u. Schmidt (1923) und Winter u. Smith (1922) behaupten, dass die γ -Glukose der Reaktionsform des Zuckers im Körper entspricht.

Allerdings ist es nicht sicher, ob der Hexosephosphorsäureester gerade die Enolform der Fruktose oder γ -Glukose ist. Im oben

erwähnten Sinne habe ich beim Versuch der Phosphorylierung des Zuckers d-Fruktose zur Anwendung gebracht.

Was das Ferment für die Phosphorylierung des Zuckers, Phosphatase, betrifft, so wurden von Embden, Griesbach, Schmitz und Laquer (1914) im Muskelextrakt das glykolytische Ferment, der Aktioator der Hexose, und das Co-Ferment der Phosphorylierung weitgehend gereinigt und isoliert dargestellt. Euler (1912), Funke (1912), H. u. B. Euler (1914), Forrai (1914) und Tomita (1922) haben das den Hexosephosphorsäureester spaltende Ferment Phosphatase in verschiedenen Organen und Geweben untersucht. Aus dem Wasserextrakt von trockener Unterhefe wurde von Euler (1912) ein Ferment gefunden, das sich nur an der Veresterung des Zuckers mit Phosphorsäure beteiligt, und das er als Phosphatase bezeichnet.

Dass die Wirkung des Enzyms ausgesprochen reversibel ist, hat Rona (1927) nachgewiesen, indem er bei Variierung der Hexosekonzentration eine Zu- bzw. Abnahme in zu der Esterbildung entgegengesetztem Sinne feststellen konnte. Endlich erhebt sich hier die Frage, ob man eine Umkehrung des Prozesses durch dasselbe Ferment, Phosphatase, oder eine eigene Phosphatase und Phosphatase annehmen soll. Auch diese Frage ist unentschieden.

Embden u. Lehnartz (1924), Embden, Lange u. Haymann (1924) haben den Einfluss der verschiedenen Ionen auf die Wirkung von Phosphatase und Phosphatase im Muskelpressaft untersucht und gefunden, dass das Kochsalz die Wirkung von Phosphatase hemmend aber die von Phosphatase beschleunigend beeinflusst. Dagegen hat das Sulfat-Ion auf die Wirkung beider keinen Einfluss.

Bei meinem Versuch wurde auch der Einfluss des Kochsalzes auf die Phosphatase- und Phosphatesewirkung in der Leber und im Muskel geprüft.

Nach Embden und seinen Mitarbeitern (1930) soll das Monophosphat der Hexose als Laktocidogen bezeichnet, und das Diphosphat als Stabilisierungsprodukt aufgefasst werden. Andererseits

behaupten Neuberg und Tomita (1923), dass die Spaltung der Hexosediphosphorsäure durch Phosphatase über die Stufe der Hexosemonophosphorsäure vor sich geht. In diesem Sinne habe ich Diphosphat sowie Monophosphat zum Versuch gebraucht.

Durch die Untersuchungen von Misaki (1927), Fuzita (1930), S. Okamura (1930) und Chikamori (1930) wurde nun experimentell bewiesen, dass die Gallensäure zum Kohlehydratstoffwechsel in inniger Beziehung steht, indem sie die Glykogenbildung der Organe, bzw. der Leber stark fördert. Es wurde schon oben erwähnt, dass die Hexosephosphorsäure als eine intermediäre Durchgangsstufe beim Abbau und Aufbau des Kohlehydrates im Organismus aufgefasst wird. In diesem Sinne ist es von grosser Bedeutung, den Einfluss der Gallensäure auf die Spaltung und Synthese der Hexosephosphorsäure im Organ, d. h. in der Leber zu erforschen, besonders weil die Gallensäure einen enterohepatischen Kreislauf bildet, indem die durch die Galle in den Darm gelangte Gallensäure wieder von der Darmschleimhaut aufgenommen, von der Leber abgefangen und dann aufs neue zur Gallenbildung verwendet wird. Andererseits wurde von Karasawa (1926/7), Hatakeyama (1927) und Takeji Okamura (1928) bewiesen, dass der Nucleinstoffwechsel und die Nucleasewirkung der Leber durch die Gallensäure gefördert werden. Auf Grund der Daten kann man wohl zu der Anschauung kommen, dass durch die Verschiebung der Phosphatpufferung die Gallensäure die Enolisierung des Zuckers begünstigt, die bekanntlich durch die vermehrten OH-Ionen gesteigert wird und höchstwahrscheinlich für die Phosphorylierung des Zuckers notwendig ist. Diese Anschauung wird immer mehr durch die Tatsache bekräftigt, dass, wie schon Ito (1930) bewiesen hat, das pH der Galle aus der Leber bei Zufuhr von Gallensäure gesteigert wird.

Experimenteller Teil.

Die Glykogenbildung findet hauptsächlich in Leber, Muskel und Niere statt. Aus diesem Grunde wurde die benutzte Ferment-

lösung aus Leber, Muskel und Niere von Kaninchen hergestellt. Dem durch Nackenschlag oder Verblutung aus der Carotis getöteten Kaninchen wurden Leber, Muskel (des Schenkels) und Niere möglichst schnell entnommen und von Fett- und Sehnengewebe sorgfältig befreit. Dann wurden sie in Hackmaschinen zerkleinert und weiter in der Reibschale mit Seesand gut verrieben. Dieser Organ- oder Gewebsbrei wurde bei Leber und Niere mit Wasser vom 10-fachen Gewicht des Organs, beim Muskel mit Wasser vom 5-fachen Gewicht der Gewebe versetzt und gut durchgerührt. Dann wurde er ohne Filtrierung unter Zusatz von Chloroform und Toluol 48 Stunden lang im Brutschrank bei 37°C digeriert. Das Autolysat wurde unter Zusatz von einigen Tropfen Eisessig wieder 24 Stunden in den Brutschrank gestellt und abfiltriert. Der abfiltrierte Organ- oder Gewebsextrakt wurde 48 Stunden gegen Wasser in der üblichen Weise dialysiert, und das Dialysat zum Versuch als Fermentlösung in Anwendung gebracht.

I. DER EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE PHOSPHATESE.

In einigen Gruppen von Kolben wurden M/15 Lävulose-Lösung: 10 ccm, M/15 KH_2PO_4 -Lösung: 1 ccm, M/15 Na_2HPO_4 -Lösung: 9 ccm, Fermentlösung: 30 ccm und Wasser: 10 ccm zusammengebracht und je 0 ccm, 2 ccm, 4 ccm, 6 ccm, 8 ccm und 10 ccm einer 1%igen Natriumcholatlösung zugesetzt. Das ganze Volumen wurde unter Wasserzusatz auf 100 ccm gebracht und unter Zusatz von 2 ccm Toluol im Brutschrank bei 37°C 48 Stunden lang stehen gelassen. Dieses Digestionsgemisch enthält etwa 0.1% Fruktose, also den gleichen Prozentsatz wie der normale Blutzuckergehalt. Das pH beträgt 7.73 und der Cholsäuregehalt 0.0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 und 0.1%.

Das Reaktionsgemisch wurde unter Zusatz von 20 ccm einer 7%igen Trichloressigsäurelösung gefällt und vom ausgefallenen Niederschlag abfiltriert. Das Filtrat, 20 ccm, wurde unter Zusatz von überschüssigem Ammoniak mit 30 ccm Magnesiamischung

versetzt und 24 Stunden lang im Eisschrank stehen gelassen. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit 2,5%igem Ammoniak dreimal gewaschen und in 25 ccm einer 8%igen Salpetersäurelösung vollständig gelöst. Diese Lösung wurde mit 20 ccm einer 25%igen Salpetersäurelösung, 20 ccm einer 34%igem Ammoniumnitratlösung und 50 ccm einer 3%igen Ammoniummolybdatlösung versetzt und 24 Stunden lang stehen gelassen. Der ausgeschiedene gelbe Niederschlag wurde abfiltriert, und die Phosphorsäure titrimetrisch nach Neumann bestimmt. Der Phosphorsäuregehalt wurde als P_2O_5 in mg in 100 ccm Digestionsflüssigkeit angegeben. Die Resultate sind in der Tabellen II-VI angegeben.

Zur Kontrolle wurden gleiche Ansätze ohne Fermentlösung oder ohne Lävuloselösung unter genau den gleichen Bedingungen behandelt, und die Phosphorsäure in der gleichen Weise bestimmt. Um die Resultate zu sichern und die enzymatische Natur in der Phosphorylierung des Zuckers nachzuweisen, wurden die Versuche einmal nur mit Fermentlösung ohne Lävulose und Phosphatgemisch (C), das andere Mal mit gekochter Fermentlösung unter Hinzufügung von Lävulose und Phosphatgemisch (D) in der gleichen Weise ausgeführt.

Bei den Versuchen mit Leber und Muskel wurde anstatt des Phosphatgemisches auch ein Gemisch von Glykokoll und Natronlauge (nach Sörensen) mit demselben $pH=7.73$ verwendet.

Der freie Phosphorsäuregehalt zeigt zwischen den beiden Versuchen mit gekochter Fermentlösung (D) und ohne Fermentlösung (A) keinen merklichen Unterschied; bei dem Versuch ohne Fermentlösung (A) beträgt der freie Phosphorsäuregehalt durchschnittlich 46.10 mg%. Beim Versuch ohne Lävulose (B) wurde der freie Phosphorsäuregehalt in allen Fällen (Leber, Niere, Muskel) ein ganz klein wenig vermindert gefunden. Diese Daten zeigen, dass im Organ- oder Gewebsextrakt eine phosphorylierende Substanz vorhanden ist. Der Phosphorsäuregehalt beim Versuch mit Fermentlösung (C) allein ist so gering, dass er nicht bestimmbar ist.

Zum besseren Verständnis, wurden die Untersuchungsreihen tabellarisch zusammengestellt. (Siehe Tabelle I).

TABELLE I.
Hauptversuch

Nr.	1% Cholat- lösung ccm	M/15 Lävulose- lösung ccm	M/15 KH_2PO_4 - Lösung (Glykokoll- gemisch) ccm	M/15 Na_2HPO_4 - Lösung ccm	Ferment- lösung ccm	Wasser ccm
1	0	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	50 (10)
2	2	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	48 (8)
3	4	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	46 (6)
4	6	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	44 (4)
5	8	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	42 (2)
6	10	10.0	1.0 (40)	9.0 (10.0)	30.0	40 (0)

Kontrolle

A	—	10.0	1.0	9.0	—	80.0
B	—	—	1.0	9.0	30.0	60.0
C	—	—	—	—	30.0	70.0
D	—	10.0	1.0	9.0	30.0 (gekocht)	50.0

TABELLE II.
Versuch mit Leber pH=7.73 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P_2O_5 mg %					Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	44.32	44.16	44.16	44.60	44.60	44.37	2.78
2	0.02	43.40	43.56	43.70	42.34	43.24	43.25	5.21
3	0.04	42.80	42.64	43.40	42.80	43.24	42.98	5.79
4	0.06	42.80	41.58	43.40	41.26	42.80	42.37	7.11
5	0.08	42.64	41.58	43.40	41.42	41.88	42.18	7.53
6	0.1	39.70	41.42	43.10	40.42	40.04	40.94	10.20
B	0	45.84	45.08	45.98	45.68	45.68	45.65	

TABELLE III.
Versuch mit Niere pH=7.73 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %					Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	42.03	41.57	42.64	42.80		42.26	4.03
2	0.02	42.03	41.42	42.64	42.64		42.18	4.21
3	0.04	41.72	41.42	41.88	42.49		41.88	4.85
4	0.06	41.27	41.27	41.27	41.88		41.42	5.86
5	0.08	40.51	40.51	41.57	42.03		41.16	6.42
6	0.1	39.59	40.51	40.96	42.18		40.81	7.18
B	0	43.86	44.16	44.31	44.16		44.12	

TABELLE IV.
Versuch mit Muskel pH=7.73 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %					Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	42.95	42.64	44.31	44.47	42.95	43.46	2.46
2	0.02	42.33	42.49	44.01	43.86	42.95	43.13	3.17
3	0.04	41.88	42.49	44.47	43.55	42.95	43.07	3.30
4	0.06	40.96	40.20	44.01	44.62	40.66	42.09	5.42
5	0.08	42.03	40.36	44.16	43.55	40.66	42.15	5.30
6	0.1	40.96	40.36	41.72	42.03	40.20	41.05	7.68
B	0	43.86	44.77	44.77	45.68	43.86	44.59	

TABELLE V.
Versuch mit Leber pH=7.73 (Glykokollgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %					Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	42.95	43.71	44.16	43.55	44.01	43.68	0.98
2	0.02	41.88	43.36	44.01	43.36	44.01	43.32	1.76
3	0.04	42.03	43.17	43.86	43.36	43.17	43.12	2.19
4	0.06	42.03	42.64	43.86	42.64	43.17	42.87	2.73
5	0.08	40.20	42.03	43.25	42.64	42.49	42.12	4.36
6	0.1	38.38	41.42	41.72	42.33	41.42	41.05	6.68
B	0	43.86	44.01	44.31	44.16	44.31	44.13	

TABELLE VI.
Versuch mit Muskel pH = 7.73 (Glykokollgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	41.42	43.71	43.36	40.66	42.29	0.84
2	0.02	41.42	43.71	42.46	40.51	42.03	1.41
3	0.04	41.88	42.64	43.25	40.03	41.95	1.58
4	0.06	39.59	41.27	43.36	38.38	40.65	4.40
5	0.08	39.59	41.95	42.33	38.38	40.56	4.60
6	0.1	38.38	39.59	42.33	38.38	39.67	6.53
B	0	41.88	43.36	43.36	42.12	42.68	

Aus den Tabellen II–VI lässt sich ersehen, dass der freie Phosphorsäuregehalt sowohl bei der Verwendung von Phosphatgemisch als auch bei der von Glykokollmischung als Puffer durch Zusatz von Cholsäure im allgemeinen herabgesetzt wird, obwohl diese Herabsetzung je nach dem Organ- und Gewebsextrakt ganz verschieden auftritt und sich je nach dem dabei verwendeten Puffer verschieden zeigt.

Die Daten zeigen, dass die Veresterung der Phosphorsäure mit Fruchtzucker in Leber, Niere und Muskel bei Zufuhr von Cholsäure gefördert wird. Bei Zufuhr von Cholsäure tritt die Veresterung der Phosphorsäure mit Fruchtzucker in der Leber am stärksten hervor; auf diese folgen dem Grad der Veresterung nach; Muskel und Niere, wie es aus den Tabellen II–IV ersichtlich ist.

Die Tabellen II, V, IV und VI zeigen, dass bei der Verwendung der Glykokollmischung der prozentuale Veresterungswert viel geringer gefunden wird als bei der des Phosphatgemisches. Diese herabgesetzte Veresterung bei der ersteren Mischung beruht höchstwahrscheinlich auf dem Kochsalzgehalt in der Glykokollmischung, weil das Kochsalz die Spaltung der Hexosediphosphorsäure im Muskel beschleunigt, aber die Synthese hemmt, wie auch schon von Embden und seinem Mitarbeiter (l. c.) bewiesen wurde.

Aus den Tabellen II–IV geht hervor, dass die Cholsäure die Veresterung der Phosphorsäure mit Fruchtzucker fördert, und dass

diese vermehrte Veresterung mit der Menge der Cholsäure parallel geht. Also beschleunigt die Cholsäure die Synthese der Hexosephosphorsäure in Leber, Niere und Muskel.

Schon Hatakeyama (1928) hat bemerkt, dass die Gallensäure die Mutarotation der Glukose im neutralen oder alkalischen Medium fördert, und dass diese Förderung mit der Menge der zugesetzten Gallensäuren parallel geht. Weiter hat er dabei beobachtet, dass die Gallensäure mit Glukose ein Kondensationsprodukt bilden kann, was durch Bestimmung der Gefrierpunkterniedrigung ermittelt wurde.

Auf Grund der oben erwähnten Daten kann man wohl vermuten, dass die Cholsäure die Phosphorylierung des Zuckers erleichtert, indem unter ihrer direkten Einwirkung der Zucker in eine reaktionsfähige Form verwandelt werden kann. Andererseits kann man auch annehmen, dass die Cholsäure unter Verschiebung der H-Ionenkonzentration nach der alkalischen Seite hin den Zucker in eine reaktionfähige Form verwandelt und dadurch die Phosphorylierung des Zuckers erleichtert. Schon Hosizima hat beobachtet, dass die Mutarotation der Glukose durch die Steigerung des pH im Phosphatpuffer gefördert wird. Nach der Angabe von Fuzita (l. c.) wird die Glykogenbildung der Leber von Kaninchen durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert. Dabei hat dieser auf Grund der Befunde von Ito (l. c.), Karasawa (l. c.) und Hatakeyama (l. c.) betont, dass die Glykogenbildung der Leber fördernde Wirkung der Cholsäure durch die vermehrten OH-Ionen in der Leber bedingt zu sein scheint, indem die Cholsäure den Nucleinstoffwechsel fördert, und die dadurch vermehrte Phosphorsäure eine Verschiebung der Pufferung nach der alkalischen Seite hin herbeiführt.

In diesem Sinne habe ich die Versuche unter Verschiebung des Puffers vom Phosphatgemisch nach der alkalischen Seite (pH=8.33) genau in der gleichen Weise wie bei den vorigen Versuchen ausgeführt.

Die Resultate sind in den Tabellen VII, VIII, IX angegeben.

TABELLE VII.
Versuch mit Leber pH=8.33 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	41.27	41.42	41.42	42.33	41.61	2.95
2	0.02	40.96	40.96	41.27	41.88	41.27	3.69
3	0.04	38.07	41.42	41.10	41.56	40.54	5.27
4	0.06	38.53	38.83	38.83	39.59	38.95	8.72
5	0.08	36.55	37.16	37.39	38.07	37.29	12.32
6	0.1	33.50	36.55	35.79	38.07	35.97	15.18
B	0	41.88	43.36	43.55	43.10	42.97	

TABELLE VIII.
Versuch mit Niere pH=8.33 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	40.03	41.72	41.27	40.96	41.00	4.05
2	0.02	38.07	41.27	41.27	40.36	40.24	5.70
3	0.04	38.07	40.96	40.36	40.36	39.94	6.35
4	0.06	38.53	40.51	40.36	39.59	39.75	6.76
5	0.08	38.07	40.96	39.59	38.83	39.25	7.85
6	0.1	37.39	40.36	39.21	38.83	38.95	8.50
B	0	42.80	43.25	42.80	42.64	42.87	

TABELLE IX.
Versuch mit Muskel pH=8.33 (Phosphatgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Veresterte Phosphor- säure in %
1	0	43.10	42.03	43.25	43.10	42.87	2.47
2	0.02	43.10	42.03	42.95	42.95	42.76	2.71
3	0.04	42.64	42.03	43.25	42.95	42.72	2.80
4	0.06	42.03	41.88	42.64	42.64	42.30	3.70
5	0.08	42.64	41.72	42.64	42.64	42.41	3.47
6	0.1	41.88	41.27	41.88	42.03	41.77	4.84
B	0	43.86	44.01	44.16	44.01	44.01	

Aus den Tabellen II–IV und VII–IX ist ersichtlich, dass der prozentuale Veresterungswert der Leber bei $\text{pH}=7.73$ mit 2.78 und bei $\text{pH}=8.33$ mit 2.95, der des Muskels im ersteren Falle mit 2.46 und im letzteren mit 2.47, und der der Niere im ersteren mit 4.03, im letzteren mit 4.05 angegeben wird.

Die Phosphorylierung des Zuckers wird also durch die Steigerung des pH erhöht. Auch bei gesteigertem pH wird die Phosphorylierung des Zuckers durch Zusatz von Cholsäure mit der Menge der Cholsäure parallel erhöht. Diese durch Cholsäure vermehrte Phosphorylierung bei $\text{pH}=8.33$ tritt in Leber und Niere stärker auf als die bei $\text{pH}=7.73$. Dagegen zeigt sich die Phosphorylierung im Muskel bei $\text{pH}=8.33$ viel schwächer als bei $\text{pH}=7.73$, wie es in den Tabellen IV, VI und IX angegeben ist.

Aus den Daten kann man den Schluss ziehen, dass die durch Cholsäure bedingte Vermehrung der Phosphorylierung des Zuckers nicht als aktivierende Wirkung der Cholsäure gegen die Phosphatase, sondern eher entweder als eine direkte Einwirkung derselben auf den Zucker, indem dadurch der Zucker in eine reaktionsfähige Form umgewandelt wird, oder als eine Verschiebung der Pufferwirkung, die von der Fermentwirkung abhängig ist, zu betrachten ist.

II. DER EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE PHOSPHATASE.

A) *Bei Spaltung der Fruktosediphosphorsäure.*

Als Substrat wurde das fruktosediphosphorsaure Natrium zum Versuch verwendet, das aus dem gereinigten Candiolin von Bayer (Fruktose-diphosphorsaures Calcium) nach der Methode von Neuberg und Sabetay (1928) bereitet wurde, indem das Calciumsalz der Fruktosediphosphorsäure unter Zusatz von berechneten Mengen des Natriumoxalates in Natriumsalz umgewandelt wurde. Dieses Natriumsalz wurde als 1%ige Lösung zum Versuch verwendet. Die Fermentlösungen der Leber, der Niere und des Muskel wurden genau in der gleichen Weise wie bei den Versuchen mit Phosphatase

hergestellt.

Als Puffer wurde dabei die Glykokollmischung nach Sørensen von $\text{pH}=7.73$ gebraucht.

Die Reihenfolge der Versuche ist in Tabelle X gezeigt.

TABELLE X.

Nr.	1% Cholat- lösung cem	1% Na. fruktose- diphosphatlösung cem	Glykokoll- mischung cem	Ferment- lösung cem	Wasser cem	Toluol cem
1	0	30	30	30	10	2
2	2	30	30	30	8	2
3	4	30	30	30	6	2
4	6	30	30	30	4	2
5	8	30	30	30	2	2
6	10	30	30	30	0	2

Diese Ansätze wurden im Brutschrank bei 37°C 48 Stunden lang stehen gelassen, unter Zusatz von Trichloressigsäurelösung enteiweiss und abfiltriert. 20 cem von dem Filtrat wurden für die freie Phosphorsäurebestimmung benutzt, die genau in der gleichen Weise wie im Phosphatesenversuch ausgeführt wurde. 30 cem dieser fruktosediphosphorsäuren Natriumlösung haben durch Veraschen durchschnittlich 100.5 mg P_2O_5 ergeben.

Die Kontrollversuche wurden alle genau wie bei dem Phosphatesenversuch ausgeführt.

Die Resultate werden in den Tabellen XI–XIII angegeben.

Aus den Tabellen XI–XIII ergibt sich, dass die Phosphorsäurespaltung aus Fruktosediphosphorsäure in Leber, Niere und Muskel je nach dem Gewebe ganz verschieden, und zwar die der Niere am stärksten ist. Auf diese folgen dem Spaltungsgrad nach die Leber und der Muskel. Die Niere enthält also mehr Phosphatase als die Leber und der Muskel, wie von vielen Autoren auch schon bewiesen wurde.

TABELLE XI.
Versuch mit Leber.

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
1	0	48.88	47.47	46.90	49.64	48.22	47.97
2	0.02	49.49	46.45	46.75	47.47	47.54	47.30
3	0.04	47.21	44.16	45.84	47.21	46.11	45.88
4	0.06	44.16	47.21	43.55	47.21	45.53	45.31
5	0.08	44.92	44.16	43.86	44.92	44.47	44.23
6	0.1	44.31	44.01	43.86	45.08	44.32	44.09

TABELLE XII.
Versuch mit Muskel.

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
1	0	19.50	21.79	21.18	21.79	21.07	20.95
2	0.02	19.69	20.88	21.18	21.79	20.89	20.77
3	0.04	18.59	18.74	21.03	20.11	19.62	19.52
4	0.06	17.07	18.14	14.48	19.20	17.22	17.13
5	0.08	16.76	16.76	13.71	19.81	16.76	16.67
6	0	14.93	14.32	12.19	15.55	14.25	14.18

TABELLE XIII.
Versuch mit Niere.

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %			Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
1	0	51.93	53.60	50.25	51.93	51.67
2	0.02	51.78	53.60	50.10	51.83	51.57
3	0.04	50.56	51.32	49.80	50.56	50.30
4	0.06	50.56	51.01	48.73	50.10	49.85
5	0.08	50.40	51.32	47.88	49.87	49.62
6	0.1	50.25	51.62	45.84	49.24	48.99

Diese Phosphatasewirkung auf die Fruktosephosphorsäure in Leber, Niere und Muskel wird durch Zusatz von Cholsäure in allen Fällen ohne Ausnahme gehemmt. Diese hemmende Wirkung der Cholsäure geht mit der Gallensäuremenge parallel und tritt bei Leber und Muskel bedeutend stärker auf als bei der Niere. Wäre die organische Phosphorsäureverbindung im Blut eine wichtige Muttersubstanz der Harnphosphate, wie Jost behauptet, so könnte man verstehen, dass die Phosphatasewirkung der Niere am wenigsten durch Cholsäure gehemmt wird, da die organischen Phosphorsäureverbindungen wie Hexosephosphorsäure und Glycerinphosphorsäure in der Niere durch Phosphatase in ihre Komponenten gespalten werden, und ein Komponent, die Phosphorsäure, im Harn ausgeschieden wird.

Wie schon oben erwähnt wurde, wird die Phosphorsäureausscheidung im Harn durch Zufuhr von Cholsäure vermehrt. Es ist auch begreiflich, dass die Phosphatasewirkung der Leber und des Muskels durch die Cholsäure stark gehemmt wird, weil die Glykogenbildung aus Zucker und die Zuckerverbrennung in Leber und Muskel als über die Hexosephosphorsäure vor sich gehend zu betrachten sind. Es ist bereits bekannt, dass die Glykogenbildung in der Leber, der Niere und im Muskel durch Zufuhr von Cholsäure stark gefördert wird, wie schon durch die Untersuchungen von Misaki (1927), Fuzita (1930), Okamura (1930) und Chikamori (1930) bewiesen wurde.

Daher scheint mir die Spaltung der Fruktosediphosphorsäure durch Leber- und Muskelphosphatase (auch Nierenphosphatase) im Sinne der Glykogenbildung durch Cholsäure gehemmt zu werden.

B) Bei Spaltung der Fruktosemonophosphorsäure.

Nach Neuberg (1918) geht die enzymatische Spaltung der Fruktosediphosphorsäure über eine Zwischenstufe von Fruktosemonophosphorsäure vor sich. Nach den neuesten Untersuchungen von Embden und Zimmermann (1925, 1927) und Embden, Jost u. Lehnartz (1930) wird der Diphosphorsäureester als eine

Stabilisierungsform aufgefasst. Aus frischer Muskelatur lässt er sich nicht isolieren. Im Muskelextrakt bildet sich das Diphosphat aus Monophosphat bei der Hemmung der Glykolyse, und auch Rieser (1926) hat sein Vorkommen in der Leber wahrscheinlich gemacht.

Seit Klärung dieses Tatbestandes bezeichnet Embden das Monophosphat als Laktacidogen.

In diesem Sinne muss der Einfluss der Cholsäure auf die Monophosphatspaltung durch Phosphatase in Leber, Niere und Muskel untersucht werden.

Die Fruktosemonophosphorsäure wurde nach dem Verfahren von Neuberg (1918) aus dem fruktosediphosphorsäuren Calcium durch partielle Hydrolyse mit Oxalsäure erhalten und als Natriumsalz zum Versuch verwendet. Die Salze der Fruktosemonophosphorsäure sind in Lösung nicht so beständig wie die der Fruktosediphosphorsäure, es findet nämlich beim Stehenlassen ihrer Lösung allmählich eine geringe Abspaltung von anorganischem Phosphat statt. Somit sind besondere Kontrollversuche zur Sicherstellung der Ergebnisse erforderlichlich.

2 g fruktosemonophosphorsaures Barium wurden in Wasser gelöst, mit einer berechneten Menge von Natriumsulfat in Lösung versetzt, filtriert und auf 100 ccm aufgefüllt. 30 ccm dieser Lösung wurden zum Versuch verwendet. Die Versuchsreihen sind in Tabelle XIV gezeigt.

TABELLE XIV.

Nr.	1% Cholat- lösung ccm	Monophosphat- lösung ccm	Glykokoll- mischung ccm	Ferment- lösung ccm	Wasser ccm	Toluol ccm
1	0	30	30	30	10	2
2	2	30	30	30	8	2
3	4	30	30	30	6	2
4	6	30	30	30	4	2
5	8	30	30	30	2	2
6	10	30	30	30	0	2

Diese Ansätze wurden im Brutschrank bei 37°C 48 Stunden lang stehen gelassen, und die befreite Phosphorsäure wurde in genau der gleichen Weise wie vorher bestimmt. 30 ccm der fruktosemonephosphorsäuren Natriumlösung ergaben durch Versaschen durchschnittlich 100.05 mg P_2O_5 . Zur Kontrolle wurde der Versuch ohne Fermentlösung angesetzt, und die dabei befreite Phosphorsäuremenge mit der der Hauptversuche verglichen.

Die Resultate sind in den Tabellen XV–XVII zusammengefasst.

TABELLE XV.
Versuch mit Leber pH=7.73 (Glykokollgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P_2O_5 mg %				Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
I	0	40.20	39.75	39.44	39.98	39.84	34.82
2	0.02	39.44	39.14	38.38	39.75	39.18	34.16
3	0.04	39.14	38.68	38.07	38.68	38.64	33.62
4	0.06	39.29	38.07	37.56	38.07	38.25	33.23
5	0.08	38.22	38.07	37.56	37.84	37.92	32.90
6	0.1	37.31	37.61	36.55	37.31	37.19	32.17
Kontrolle	0	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	

TABELLE XVI.
Versuch mit Niere pH=7.73 (Glykokollgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P_2O_5 mg %				Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
1	0	46.75	49.64	48.73	48.73	48.46	43.44
2	0.02	43.86	48.88	48.58	47.47	47.20	42.17
3	0.04	41.88	45.68	44.16	45.39	44.28	39.26
4	0.06	41.57	45.39	43.36	44.16	43.62	38.60
5	0.08	40.51	45.28	42.49	43.36	42.91	37.89
6	0.1	40.96	43.86	40.96	40.96	41.69	36.67
Kontrolle	0	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	

TABELLE XVII.
Versuch mit Muskel pH=7.73 (Glykokollgemisch)

Nr.	Cholat- menge in %	P ₂ O ₅ mg %				Durch- schnittswert	Befreite Phosphor- säure in %
1	0	28.02	29.39	28.48	28.92	28.70	23.68
2	0.02	27.41	27.41	27.41	28.02	27.56	22.53
3	0.04	27.41	28.93	26.19	27.41	27.49	22.46
4	0.06	27.71	26.65	25.74	26.65	26.69	21.68
5	0.08	27.41	25.88	25.88	25.88	26.26	21.25
6	0.1	24.36	25.13	25.13	25.74	25.09	20.08
Kontrolle	0	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00	

Aus den Tabellen XV–XVII geht hervor, dass auch in diesem Fall die Phosphorsäurespaltung aus Fruktosemonophosphat durch Phosphatase bei der Niere am stärksten auftritt und durch Cholsäure am stärksten gehemmt wird, während im Gegensatz dazu beim Versuch mit Fruktosediphosphorsäure das Umgekehrte der Fall war. Diese hemmende Wirkung der Cholsäure geht mit der Menge derselben parallel, sowohl bei Niere und Leber als auch beim Muskel, obwohl der Hemmungsgrad je nach der Art der Gewebe verschieden ist. Dem Hemmungsgrad nach folgen auf einander: die Niere, der Muskel und die Leber. Also stehen die Leber-, Muskel- und Nierenphosphatasen gegen Monophosphat und Diphosphat gerade in entgegengesetztem Verhältnisse. Was dies zu bedeuten hat, muss weiter verfolgt werden. Doch scheint es mir darauf zu beruhen, dass der Monophosphorsäureester, welcher sehr labil ist, in der Leber und im Muskel meistens für die Synthese des Glykogens verwendet wird, also in der Leber und im Muskel ein synthetischer Vorgang (Phosphatesewirkung) bei Anwesenheit von Cholsäure vorherrschend auftritt, während er in der Niere hauptsächlich für die Befreiung des anorganischen Phosphates benutzt wird, das heisst, dass in der Niere der Spaltungsvorgang (Phosphatasewirkung) vorherrscht.

Obwohl sich zwischen den beiden enzymatischen Spaltungen

der Fruktosedi- und Fruktosemonophosphorsäure bei Anwesenheit von Gallensäure je nach den Organen in entgegengesetzter Richtung ein grosser Unterschied zeigt, werden sie doch durch Cholsäure im allgemeinen gehemmt, und diese Hemmung geht mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

ZUSAMMENFASSUNG.

Der Einfluss der Cholsäure auf die fermentative Phosphorylierung der Fruktose und auf die enzymatische Spaltung der Fruktosediphosphorsäure und der Fruktosemonophosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel wurde untersucht, und es wurden die folgenden Resultate gewonnen:

1. Die Cholsäure fördert die Synthese der Fruktose und der Phosphorsäure in Leber, Niere und Muskel. Diese fördernde Wirkung geht mit der Menge der zugesetzten Cholsäure parallel.

2. Die Synthese der Fruktose und der Phosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel wird durch Kochsalz gehemmt.

3. Die Synthese der Hexosephosphorsäure tritt bei Zusatz von Cholsäure in der Leber am stärksten hervor, auf diese folgen nach dem Veresterungsgrad Muskel und Niere.

4. Diese Synthese der Hexosephosphorsäure wird sowohl mit als auch ohne Cholsäure durch Vermehrung des pH im Puffer gesteigert, und zwar besonders bei Zusatz von Cholsäure.

Aus den Daten geht hervor, dass die die Synthese der Hexosephosphorsäure fördernde Wirkung der Cholsäure entweder auf der Umwandlung des Zuckers in eine reaktionsfähige Form oder auf der Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration im Medium beruht, welche letztere die Fermentwirkung stark beeinflusst.

5. Die Cholsäure wirkt hemmend auf die Spaltung der Fruktosediphosphorsäure und der Fruktosemonophosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel, und diese hemmende Wirkung tritt mit der Menge der einwirkenden Cholsäure parallel auf.

6. Diese hemmende Wirkung der Cholsäure tritt je nach Substrat und Organ in ganz entgegengesetzter Richtung ein. Es

wird nämlich bei der Spaltung der Fruktosemonophosphorsäure die Phosphatasewirkung der Niere durch Cholsäure viel stärker als die der Leber und des Muskels gehemmt, während bei der der Fruktosediphosphorsäure die Phosphatasewirkung der Leber und des Muskels viel stärker als die der Niere gehemmt wird.

Diese Daten zeigen, dass der synthetische Vorgang der Hexosephosphorsäure im Muskel und in der Leber im Vordergrund steht, während in der Niere der spaltende Vorgang der Hexosephosphorsäure vorherrscht, und zwar unter der Voraussetzung, dass einerseits das Monophosphat als eine labile Übergangsform bei der Glykogenbildung und der Zuckerverbrennung, und das Diphosphat als eine Stabilisierungsform aufgefasst wird, andererseits die Niere viel mehr Phosphatase als die Leber und der Muskel enthält und als ein organisches Phosphat spaltendes Organ funktioniert, um das anorganische Phosphat im Harn zu bereiten.

Aus dem Ergebnisse kann man wohl den Schluss ziehen, dass die Gallensäure die Glykogenbildung im Organismus fördert, indem sie die Phosphatasewirkung hemmend und die Phosphatesewirkung in den Organen und Geweben fördernd beeinflusst.

LITERATUR.

- Bleyer, B. u. Schmidt, H. (1923): Biochem. Z., **135**, 546.
 " " " " **138**, 119.
 " " " " **141**, 278.
 Brugsch, Th. u. Horsters, H. (1926): Biochem. Z., **175**, 120. u. 127.
 Chikamori, S. (1930): Okayama Igakkai Zasshi, **42**, Jg, 1963.
 Embden, G., Baldes, K. u. Schmitz, E. (1912): Biochem. Z., **45**, 108.
 Embden, G., Griesbach, W. u. Laquer, F. (1914): Z. f. physiol. Chem., **93**, 94.
 Embden, G., Griesbach, W. u. Schmitz, E. (1914): Z. f. physiol. Chem., **93**, 1.
 Embden, G., Kalberlah, F. u. Engel, H. (1912): Biochem. Z., **45**, 42.
 Embden, G., Jost, H. u. Lehnartz, M. (1930): Z. f. physiol. Chem., **189**, 261.
 Embden, G. u. Haymann, C. (1924): Z. f. physiol. Chem., **137**, 154.
 Embden, G. u. Kraus, F. (1912): Biochem. Z., **45**, 1.
 Embden, G. u. Laquer, F. (1914): Z. f. physiol. Chem., **93**, 94.
 " " (1917): " **98**, 181.

- " " (1926): " 113, 1.
 Embden, G. u. Lehnartz, E. (1924): Z. f. physiol. Chem., **134**, 243.
 Embden, G. u. Zimmermann, M. (1925): Z. f. physiol. Chem., **141**, 225.
 " " (1927): " 167, 114.
 Euler, H. (1912): Z. f. physiol. Chem., **77**, 488.
 Euler, H. u. Beth. (1914): Z. f. physiol. Chem., **92**, 292.
 Euler, H. v. u. Ohlsén, H. (1911): Biochem. Z., **37**, 313.
 Euler, H. Ohlsén, H. u. Johansson, D. (1917): Biochem. Z. **84**, 402.
 Forrai, E. (1924): Biochem. Z., **145**, 47.
 Funke, F. (1912): Z. f. physiol. Chem., **79**, 375.
 Fuzita, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 151.
 Fuzita, S. (1930): Jl. of Biochem., **12**, 383.
 Harden, A. u. Young, W. J. (1905): Proc. chem., Soc., **21**, 189.
 " " (1908): Proc. Roy. Soc., **80**, 305.
 " " (1911): Biochem. Z., **32**, 173.
 Hatakeyama, T. (1927): Jl. of Biochem., **8**, 261.
 " (1928): " 8, 371.
 Itoo, T. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 105.
 Jost, H. (1927): Z. f. physiol. Chem., **165**, 171.
 Karasawa, R. (1926): Jl. of Biochem., **6**, 139.
 " (1927): " 7, 145.
 Lange, H. (1924): Z. f. physiol. Chem., **137**, 105.
 Lebedew (1912): Ber. dtsh. chem. Ges., **45**, 3271.
 Lohmann, K. (1928): Bioch. Z., **194**, 306.
 Meyerhof, O. (1926): Biochem. Z., **178**, 395.
 " (1927): " 183, 176.
 Meyerhof, O. u. Lohmann, K. (1927): Biochem. Z., **185**, 113.
 Misaki, K. (1927): Jl. of Biochem., **8**, 235.
 Neuberg, C. (1918): Biochem. Z., **88**, 432.
 Neuberg, C. u. Gottschalk, A. (1926): Biochem. Z., **146**, 164.
 Neuberg, C. u. Sabetay, S. (1925): Biochem. Z., **161**, 240.
 Okamura, Takeji (1928): Jl. of Biochem., **8**, 391.
 Okamura, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 165.
 Oppenheimer, S. (1912): Biochem. Z., **45**, 18.
 Rieser, O. (1926): Z. f. physiol. Chem., **161**, 149.
 Robison, R. (1922): Biochem. J., **16**, 809.
 " (1923): " 17, 286.
 Rona, P. u. Iwasaki, K. (1927): Biochem. Z., **184**, 318.
 Tomita, M. (1922): Biochem. Z., **131**, 170.
 Winter, L. B. u. Smith, W. (1922): Jl. of Physiol., **57**, 100.
 Young, W. J. (1911): Biochem. Z., **32**, 188.

ON THE PHYSICO-CHEMICAL DIFFERENCES BETWEEN α -, β - AND γ -HEMOGLOBINS.

By

TETSUTARO TADOKORO, MAKOTO ABE,
AND KATSUJI YOSHIMURA.

(Received for publication, April 22, 1931)

It is well known that the crystalline forms of hemoglobin, and also some other physico-chemical properties differ in different kinds of animals. Furthermore, these properties of hemoglobin (See Barcroft, 1929) differ with the subvariety of the same animal, as shown in the difference between brown- and papio-bat or the differences between white- and black- or brown- and Alexander-rat. The equilibrium of chemical reaction between oxyhemoglobin and carboxyhemoglobin indicates a definite ratio between the concentration of carbon monoxide and oxygen as shown in the formula

$$\frac{[\text{CO.Hb}]}{[\text{O}_2\text{.Hb}]} = K \frac{[\text{CO}]}{[\text{O}_2]}$$

Here the constant K varies not only with the kind of animals but also with the subvarieties of the same animals as reported by Anson, Barcroft and Mirsky (1925). Abrahamsen (See Barcroft, 1929) stated that the same differences occur in the oxygen capacity of hemoglobin. Further, Gallerani and Ostermann (1923) stated that the positions of the first band (α) of the absorption spectrum changes from oxyhemoglobin to carbohemoglobin and its distance is different in different subvarieties of animals. So the equilibrium between these two hemoglobins seems to differ according to the various physiological conditions of the animals. Recently, on the other hand, it is said by many investigators that the hemoglobin molecule is not in static but in dynamic form. Many years ago Anson, Reichert and Brown (1909) reported

that the crystal of hemoglobin is distinguishable in α -, β - and γ -forms and the distribution of each quantity is different with the individual animals. So it is possible to distinguish oxyhemoglobin crystals in two forms as a plate-like ortho rhombic or a short prism and a plate-like monoclinic system. The methemoglobin is also distinguished as α - and β -forms of ortho rhombic system. Bohr (See Barcroft, 1929) reported that the oxygen capacity of hemoglobin obtained from nine horses was distinguished into four isomers as α -, β -, γ - and δ -form. From those reports, it may be supposed that hemoglobin or its derivatives contained some isomers in the blood of the same individual and their quantitative ratio is also different by sexes. And these distinctions of isomers are obtained only by physico-chemical experiment on hemoglobin but not by chemical experiment concerning the constitution of hemoglobin molecule. So the authors undertook the following experiments, using isolated pure oxyhemoglobin as samples.

I. PREPARATION OF CRYSTALS OXYHEMOGLOBIN.

Horse's blood is defibrinated and strained through muslin and centrifuged at 2000–2400 revolutions per minute. The serum is decanted, the sediment of corpuscles stirred up with 0.85% NaCl. in amount equal to that of the serum and again centrifuged. The solution is decanted and the sediment dissolved in the smallest quantity of water at 37°C. To the solution cooled to 0°C is added half its volume of ice-cold ether; the mixture is placed in a separating funnel, shaken several times, and allowed to stand for 24 hours at 0°C. Of the three layers which form, the lowest clear one is carefully collected (the middle one contains residues of corpuscles and is gelatinous, the top one is ether), filtered into a flask kept at 0°C and freed from ether by a current of air purified by passage through permanganate and sulphuric acid. To the ice-cold solution is added one quarter of its quantity of ice-cold alcohol. This prepare is kept in a freezing mixture. In 12 hours crystals are obtained.

II. PURIFICATION OF OXYHEMOGLOBIN.

The crystals are separated by a centrifuge at 0°C , washed with ice-cold 20% alcohol and then water, dissolved in distilled water at 30°C , cooled to -3°C and left to crystallize. This is repeated 2 or 3 times. The crystals are finally placed on filter paper and dried *in vacuo* for 6 hours over sulphuric acid. They are then powdered and dried in hydrogen at 100°C .

III. ISOLATION OF GLOBIN AND SEPARATION OF ITS ISOMERS.

Pure oxyhemoglobin crystals were dissolved in hot water at 30°C and a few drops of strong HCl added, stirring vigorously. They were allowed to stand still for 10 minutes. The process was repeated many times until the oxyhemoglobin solution showed dark-brown color, contaminated with no red. When a small part of this dark brown solution was diluted and examined, the characteristic absorption band of oxyhemoglobin was not visible at all. Then to the dark brown solution was added one fifth volume of alcohol and half the volume of ether and shaken in a separating funnel. After settling, the ethereal layer was taken out and the manipulation repeated many times until the ethereal solution showed no color. The residual water solution was freed from ether and ammonia added till the solution showed weak acid reaction. The precipitates were centrifuged out. The upper solution was added to a small quantity of ammonia and centrifuged again. This was repeated three times and the separated precipitate of each time was called α -, β - and α -, β - and γ . Each precipitate was mounted in water, dissolved with dilute HCl solution and precipitated by ammonia, then dissolved again and precipitated with NaOH. The last precipitate was dissolved in weak HCl solution and after being dialyzed for one week in a water current, it was precipitated by alcohol, washed with alcohol and ether and dried in a H_2SO_4 desiccator.

IV. NITROGEN, SULPHUR AND ASH CONTENT OF GLOBINS.

Samples thus obtained were analyzed by the ordinary method

and their sulphur content was estimated by Denis-Benedict's method. The following numbers show the percent of dry matter.

TABLE I.
Nitrogen, sulphur and ash content.

Sex & Age	Globin	Nitrogen	Sulphur	Ash
Male 5.	α	16,12	0,368	1,136
"	β	16,09	0,379	1,027
"	α_1	15,81	0,188	0,263
"	β_1	18,15	0,287	0,366
"	γ_1	17,90	0,408	0,104
Castrated male 9.	α_2	17,14	0,361	0,328
"	β_2	16,64	0,334	0,289
"	α_3	16,86	0,374	0,000
"	β_3	16,07	0,348	0,000
"	γ_3	16,32	0,527	0,127

These numerical values of globin coincide with those of the early investigators and the sulphur content is divergent according to the isomers as decreased from γ -, to β - and α -globin distinctly. These tendencies are very common in isomers of the same kind of proteins as is shown in the following table.

TABLE II.
Sulphur content of proteins.

	Conglutin	Glycinin	Globulin, bean	Hordein, Naked barley	Serumglobu- lin, Horse	Crysta- llin
γ	—	—	—	0,03	(Eugl.) 1,11	—
β	1,67	1,17	1,50	0,40	(Pseu- β 0,98	1,27
α	0,56	0,63	0,79	0,19	dogl.) α 0,90	0,56
Author	Osborne	Osborne	Johns and Wakers	Takahashi & Shirahama (1928)	Fuld and Spiro (1901)	Mörner (1909)

V. THE ISO-ELECTRIC POINT OF GLOBINS.

The iso-electric point of globins was determined by Michaelis and Nakashima's method (1923) which is based on the principle of mutual precipitation of different colloidal solutions. The pH value at which the maximum precipitation takes place is the iso-electric point of the protein.

Mastix sol:—5 g of mastix was dissolved in 100 cc. of 96% alcohol. To 10 cc. of this solution was added 200 cc. of distilled water and filtered.

Protein solution:—0.1 g of moisture-freed protein was dissolved in 100 cc. of n/200-HCl solution.

The colloid mixture was prepared in the following way:

TABLE III.

Mastix : Protein	Mastix sol	n/200-HCl	Protein solution	Water
5 : 1	5 cc.	3 cc.	1 cc.	5 cc.
5 : 2	5 cc.	2 cc.	2 cc.	5 cc.
5 : 4	5 cc.	—	4 cc.	5 cc.

The water was mixed with the protein solution, n/200-HCl added and at last 5 cc. of mastix sol was added.

The series of different hydrogen ion concentrations was prepared as follows:—

TABLE IV.

	1	2	3	4	5	6	7
n/10 Na-acetate (cc.)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
n/100 NaOH (cc.)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7
Distilled water (cc.)	1.9	1.8	1.7	1.6	1.5	1.3	0.7
Colloid Mixture (cc.)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5

The precipitation phenomena are indicated by the following signs.

- (—) No precipitation took place,
- (+) The solution became turbid,
- (×) Precipitation took place,
- (××) Precipitation appeared in coarse suspension, and
- (×××) Precipitation formed and the supernatant liquid became clear.

TABLE V.

1. α								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	—	—	—	—
	30 m	×	×	×	+	—	—	—
	1 h	×	×	×	×	+	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	—	—
	24 h	×	×	×	×	×	—	—
5 : 2	10 m	+	+	+	+	—	—	—
	30 m	×	×	×	+	—	—	—
	1 h	×	×	×	×	+	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	—	—
	24 h	×	×	×	×	×	—	—
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	—	—
	30 m	×	×	×	×	×	+	—
	1 h	×	×	×	×	×	+	—
	5 h	×	×	×	×	×	+	—
	24 h	×	×	×	×	×	+	—
pH				280 mv 7.35				

TABLE V.

2. β								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	+	-	-
	30 m	x	x	x	x	+	-	-
	1 h	xx	xx	xx	x	+	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	xx	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	xxx	+	-	-
5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	-	-
	30 m	x	x	x	x	+	-	-
	1 h	x	x	xx	xx	x	+	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	+	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	+	-
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	-	-
	30 m	+	+	x	x	x	+	-
	1 h	+	x	x	x	xx	x	-
	5 h	xx	xx	xxx	xxx	xxx	x	-
	24 h	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	-
pH				226 mv 7.48				

TABLE V.

3. α_1								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	-	-	-	-
	30 m	x	x	+	-	-	-	-
	1 h	xx	xx	+	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	x	x	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	x	x	+	-	-

5 : 2	10 m	+	+	+	-	-	-	-
	30 m	x	x	x	+	-	-	-
	1 h	xx	xx	xx	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
5 : 4	10 m	+	+	+	-	-	-	-
	30 m	x	x	x	+	-	-	-
	1 h	x	xx	x	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-

pH $\frac{347 \text{ mv}}{7.24}$

TABLE V.

4. β_1

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	-	-	-	-
	30 m	x	x	x	-	-	-	-
	1 h	xx	xx	xx	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	+	-	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
5 : 2	10 m	+	+	+	+	-	-	-
	30 m	x	x	x	+	-	-	-
	1 h	xx	xx	xx	+	+	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	+	+	-
5 : 4	10 m	+	+	+	+	-	-	-
	30 m	x	x	x	x	+	-	-
	1 h	x	x	xx	x	+	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	xxx	x	+	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	xxx	x	+	-

pH $\frac{304 \text{ mv}}{7.34}$

TABLE V.

5. γ_1								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	+	—	—
	30 m	×	×	×	×	+	—	—
	1 h	×	×	×	×	+	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	+	—
	24 h	×	×	×	×	×	+	—
5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	—	—
	30 m	×	×	×	×	×	—	—
	1 h	×	×	×	×	×	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	+	—
	24 h	×	×	×	×	×	+	—
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	+	—
	30 m	×	×	×	×	×	+	—
	1 h	×	×	×	×	×	×	—
	5 h	×	×	×	×	×	×	—
	24 h	×	×	×	×	×	×	—
		pH $\frac{278 \text{ mv}}{7.39}$						

TABLE V.

6. α_2								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	—	—	—
	30 m	×	×	+	+	—	—	—
	1 h	×	×	×	+	—	—	—
	5 h	×	×	×	+	—	—	—
	24 h	×	×	×	+	—	—	—

5 : 2	10 m	+	+	+	+	-	-	-
	30 m	x	x	x	+	-	-	-
	1 h	xx	xx	xx	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	+	-	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	+	-	-	-
5 : 4	10 m	+	+	+	+	-	-	-
	30 m	x	x	x	+	-	-	-
	1 h	x	xx	x	+	-	-	-
	5 h	xxx	xxx	xxx	x	-	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	-	-	-
		pH		468 mv 7,06				

TABLE V.

7. β_2

Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	-	-	-
	30 m	+	+	+	+	-	-	-
	1 h	x	x	x	x	-	-	-
	5 h	xx	xx	xx	x	-	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	-	-	-
5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	-	-
	30 m	x	x	x	x	+	-	-
	1 h	x	x	x	x	+	-	-
	5 h	xx	xx	xx	x	+	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	x	+	-	-
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	-	-
	30 m	x	x	x	x	+	-	-
	1 h	x	x	xx	x	x	-	-
	5 h	xxx	xx	xxx	xxx	x	-	-
	24 h	xxx	xxx	xxx	xxx	x	-	-
		pH		403 mv 7,17				

TABLE V.

8. α_s								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	—	—	—
	30 m	+	+	+	+	—	—	—
	1 h	×	×	×	×	—	—	—
	5 h	×	×	×	×	+	—	—
	24 h	×	×	×	×	×	—	—
5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	—	—
	30 m	+	+	+	+	+	—	—
	1 h	×	×	×	×	×	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	+	—
	24 h	×	×	×	×	×	×	—
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	+	—
	30 m	+	+	×	+	+	+	—
	1 h	×	×	×	×	×	×	—
	5 h	×	×	×	×	×	×	+
	24 h	×	×	×	×	×	×	×
		pH $\frac{446 \text{ mv}}{7.10}$						

TABLE V.

9. β_s								
Colloid Ratio	Time	I	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	+	—	—
	30 m	+	+	+	+	+	—	—
	1 h	×	×	×	×	×	—	—
	5 h	×	×	×	×	×	—	—
	24 h	×	×	×	×	×	—	—

5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	+	-
	30 m	+	+	+	+	+	+	-
	1 h	×	×	×	×	×	+	-
	5 h	×	×	×	×	×	×	-
	24 h	×	×	×	×	×	×	-
		×	×	×	×	×	×	×
5 : 4	10 m	+	+	+	+	+	+	-
	30 m	+	+	+	+	×	+	+
	1 h	×	×	×	×	×	×	+
	5 h	×	×	×	×	×	×	×
	24 h	×	×	×	×	×	×	×
		×	×	×	×	×	×	×

pH $\frac{417 \text{ mv}}{7.15}$

TABLE V.

10. γ_8								
Colloid Ratio	Time	1	2	3	4	5	6	7
5 : 1	10 m	+	+	+	+	+	+	-
	30 m	×	×	×	×	×	×	-
	1 h	×	×	×	×	×	×	-
	5 h	×	×	×	×	×	×	+
	24 h	×	×	×	×	×	×	+
		×	×	×	×	×	×	×
5 : 2	10 m	+	+	+	+	+	+	+
	30 m	×	×	×	×	×	×	+
	1 h	×	×	×	×	×	×	+
	5 h	×	×	×	×	×	×	+
	24 h	×	×	×	×	×	×	×
		×	×	×	×	×	×	×
4 : 5	10 m	+	+	+	+	+	+	+
	30 m	+	+	+	+	+	×	+
	1 h	×	×	×	×	×	×	×
	5 h	×	×	×	×	×	×	×
	24 h	×	×	×	×	×	×	×
		×	×	×	×	×	×	×

pH $\frac{402 \text{ mv}}{7.17}$

In the above experiments the isoelectric points were determined with a potentiometer, using quinhydrone electrode at 18°C.

From the above tables, it will be clear that the isoelectric point of globin is always different in its isomers at α -, β - and γ -globin. These facts indicate to one that the hemoglobin of the same individual animal is composed of many isomers which are different in respect to globin molecule in alkalinity of their isoelectric point.

VI. THE SPECIFIC ROTATORY POWER OF α -, β - AND γ -GLOBIN.

The rotatory power of globin has been reported already by some authors but not its difference in isomers of globin. So it is highly pertinent in this investigation to examine the difference of the rotatory power of α -, β - and γ -globin acid solution. 0.1 g of each kind of globin was dissolved in 60 cc. of n/400-HCl solution. After the indicated time, the solution was examined by means of a Haensch-Schmidt's three shadow polariscope and the following results obtained.

TABLE VI.
Specific rotatory power of globins.

Globin (α) _D ¹⁸ after 12 hrs.	α	β	α_1	β_1	γ_1
	-71.86	-89.82	-83.83	-98.80	-97.84
Globin (α) _D ²⁰ after 12 hrs.	α_2	β_2	α_3	β_3	γ_3
	-47.90	-69.46	-89.82	-93.41	-95.81

In the above table, the specific rotatory power of globin is different by its isomers and that of the more alkaline one is always greater than that of the less alkaline in its isoelectric point. These tendencies are very common in isomers of the same kind of proteins as is shown in table VII.

VII. SEPARATION AND DETERMINATION OF AMINO ACIDS OF α -, β - AND γ -GLOBIN.

A difference between isomers in amino acid of the globins as to quantity and kind may be expected from the data of the above

TABLE VII.
Specific rotatory powers of proteins.

Protein	Serum-globulin	Crystallin	Clupein	Globulin Horse bean	Gliadin, Wheat.	Zein, Zea mais.
Specific Rotatory Power	α - 50,4	-46,9	22,0	-46,9	- 81,6	-29,6
	β -48,8	- 43,3	41,2	-43,3	-95,0	-40,0
Author	Mörner	Mörner	—	Osborne	Lindet and Amann (1907)	

results which shows that the structures of the globin molecules differ markedly.

The authors thus undertook the following experiments according to Van Slyke's advanced method (1915). To a given quantity of sample was added 20 times its weight of 20% HCl; the mixture was boiled and hydrolyzed for 20 hours on the sand bath under a reflux condenser. Next, almost all the HCl of the solution was driven off under a diminished pressure at below 40°C. The residue was made slightly alkaline by the addition of 10% suspension of $\text{Ca}(\text{OH})_2$. The ammonia nitrogen liberated was distilled into a standard H_2SO_4 under a diminished pressure at below 40°C. The remaining fluid was filtered and separated from melanin substances. The melanin nitrogen was determined by Kjeldahl's method. The filtrate was acidified with HCl and evaporated under a diminished pressure at below 40°C. To the concentrated filtrate were added 18 cc. of concentrated HCl and 15 g of phosphotungstic acid and the diamino acids were precipitated. After standing undisturbed for 48 hours, the precipitate was filtered by suction and treated with a mixture of amylalcohol and ether. Using Van Slyke's micro-apparatus the free amino nitrogen was determined.

In the table it is seen that the content of amide- and melanine nitrogen is decreased while that of arginine, histidine and cystine nitrogen is the contrary, according to the order of α -, β - and γ -globin.

TABLE VIII.

Kind of protein	Kind of N.	Total N.	Amide N.	Melanine N.		Bacic N.	Monoamino N.	Arginine N.	Histidine N.	Cystine N.	Lysine N.
				I	II						
Globin (male)		18.120	0.877	0.296	0.311	5.178	11.456	1.142	3.270	0.082	0.685
		17.470	0.608	0.188	0.298	4.405	11.970	1.510	2.120	0.062	0.712
		16.468	1.120	0.234	0.213	4.695	10.194	1.622	2.404	0.076	0.593
		16.479	0.949	0.175	0.239	5.315	9.761	1.488	2.670	0.107	1.049
		15.981	0.796	0.107	0.172	5.509	9.395	1.463	3.309	0.098	0.639
		100.00	4.841	1.633	1.721	28.581	63.244	6.299	18.046	0.450	3.785
		100.00	3.482	1.081	1.705	25.214	68.518	8.645	12.136	0.356	4.077
		100.00	6.807	1.426	1.297	28.527	61.943	9.855	14.605	0.462	3.605
		100.00	5.999	1.064	1.452	32.251	59.234	9.030	16.203	0.651	6.367
		100.00	4.983	0.673	1.077	34.477	58.790	9.158	20.709	0.613	3.997

VIII. THE DOUBLE SALT OF Pt-Cl-GLOBIN.

It is said that globin has the same nature as histon and protamin but its double salt of PtCl_4 has not yet been reported. The authors intended in the following experiment to examine the difference between these double salts of α -, β - and γ -globin. 0.1 g of anhydrous globin was dissolved into 15 cc. of $n/100$ HCl and 10% PtCl_4 solution added until no precipitate was formed. This amorphous precipitate was washed with water, alcohol and ether and dried in a H_2SO_4 desiccator and analyzed by the ordinary method to estimate its nitrogen and platinum content.

According to the table the content of nitrogen shows no definite differences between α -, β - and γ -globin, and the content of platinum is increased in the order of α -, β - and γ -globin.

The numerical values of the N and Pt contents in the above table may be compared with that of protamins as is shown in the following.

TABLE IX.

Globin	α	β	α_1	β_1	γ_1
Nitrogen %	12.770	12.589	12.196	11.899	12.411
Pt %	10.656	14.817	13.476	12.902	16.375
Globin	α_2	β_2	α_3	β_3	γ_3
Nitrogen %	12.094	12.823	12.560	13.263	12.109
Pt %	10.914	12.827	8.785	11.253	11.301

TABLE X.

Protamin	Salmin	Clupein	Seombrin	Sturin	Protamin Tymus.	Clupein
N %	14.8	12.6	13.2	14.2	9.9	12.6
Pt %	24.7	24.6	24.1	23.1	21.7	21.7
Cl %	26.5	26.5	25.9	25.4	24.1	27.6

SUMMARY.

From the results of the above experiments we can summarise the following differences in physicochemical properties between the α -, β - and γ -hemoglobin of the same individual animals.

1. In the order of α -, β - and γ -globin, the pH value of the iso-electric point is increased and so its alkalinity is increased.

2. In the same order of isomers of globin the sulphur content is increased.

3. In the same order, the specific rotatory power of globin-HCl-solution is increased.

4. In the same order of isomers of globin the content of amide and melanine nitrogen is decreased while that of arginine, histidine and cystine nitrogen is increased.

5. In the same order, while the nitrogen content of the double

salt of PtCl-globin shows no definite difference, their Pt-content is increased.

REFERENCES

- Anson, Barcroft and Mirsky (1925): *Proc. Roy. Soc.*, **97**, 61.
Anson, Reichert and Brown (1909): The crystallography of hemoglobins.
Barcroft (1929): *Die Atmungsfunktion des Blutes II*, Berlin.
Fuld and Spiro (1901): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **34**, 207.
Gallerani et Ostermann See Vlès (1923): *Arch. phys. Biol.*, **8**, 6.
Kossel (1929): *Protamine and Histone*, Leipzig.
Lindet und Amann (1907): *Bull. de la Sec. Chim.*, **1**, 968.
Michaelis and Nakashima (1923): *Biochem. Zeitschr.*, **143**, 484.
Mörner (1909) *Ibid.*, **53**, 452.
Osborne: *The vegetable proteins*, N. Y., 191.
Takahashi and Shirahama (1928): *Journ. Agric. Chem. Soc. Japan*, **43**, 288-95.
Van Slyke (1915): *Journ. Biol. Chem.*, **22**, 281.

ÜBER DIE PHYTASE UND DIE SPEZIFITÄT DER PHOSPHOESTERASE.

VON

KIYOMA HORIUCHI.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 23. April, 1931).

Die Beziehung der Spezifität der Fermentwirkung zu der chemischen Konstitution der Substrate gehört einem besonders interessanten Gebiete der Fermentforschung an. Bei den Carbohydrasen war schon ihre strenge Spezifität festgestellt. Eifrige Studien über Proteasen wurden neuerdings von Waldschmidt-Leitz, Euler, Abderhalden und anderen mit schönen Resultaten ausgeführt, und die erzielte scharfe Begrenzung des Wirkungsbereichs von einzelnen Proteasen hat zum Fortschritt der Eiweisschemie einen wichtigen Beitrag geliefert. Bei Esterasen wurde aber ihre Beeinflussbarkeit durch den chemischen Bau der Substrate nur ungenügend erforscht.

Phosphatase gehört eigentlich zu den Esterasen. Die Substrate dieses Ferments sind aber nicht auf Phosphorsäureester beschränkt. Kürzlich hat Kurata (1931) im hiesigen Institut die fermentative Hydrolyse der Diphenylpyrophosphorsäure untersucht und hat dabei Pyrophosphatase, welche die Sauerstoffbrücke der Pyrophosphorsäure aufspaltet, der Phosphoesterase gegenübergestellt, welche die Bindung zwischen Phosphorsäure und Alkohol hydrolysiert. Beide Fermente konnten von ihm scharf getrennt werden. Phosphatase ist also eine allgemeine Benennung der Fermente, die überhaupt anorganische Orthophosphorsäure aus einer zusammengesetzten Verbindung abzuspalten imstande sind, und umfasst eine Anzahl verschiedener Fermente, die je für eine Bindungsform der Phosphorsäure spezifisch eingerichtet sind. Die

Arten der Phosphatase beschränken sich darum nicht auf Esterase und Pyroacidase, worüber eine diesbezügliche Untersuchung im hiesigen Institut im Gang ist. Was der Verfasser unter Leitung von Prof. Akamatsu untersuchte, war die Frage der Spezifität der Phosphoesterase.

Versuche von Asakawa (1929) mit verschiedenen Monophosphorsäureestern ergaben, dass die Estersäuren in bestimmtem Dissoziationszustande mit dem Ferment reagieren, und dass diese Dissoziation der Substrate je nach der Art ihrer Alkoholreste sich bald auf die der ersten, bald auf die der zweiten Stufe der Estersäuren bezieht. Dadurch wurde die Lage des Ph-Optimums regelmässig von der chemischen Natur der Alkoholreste, sowie von der elektrochemischen Natur des Ferments bedingt. Wenn eine Dioxyverbindung mit 2 Molekülen Phosphorsäure verestert wird, so verhält sich fermentativ jede Esterbindung für sich, wie es beim respektiven Monoester zu erwarten ist. Dies wurde von Kobayashi (1929) bei der Diphosphoglycerinsäurespaltung beobachtet. Resorcindiphosphorsäure macht auch keine Ausnahme; darüber wird in Kürze von Manaka mitgeteilt werden.

Die Resultate mit Diphosphoverbindungen sollen aber selbstverständlich nicht ohne weiteres auf Polyphosphorsäureester angewandt werden. Um das Verhältnis aufzuklären, wurde die fermentative Spaltung des Phytins zum Versuch herangezogen.

Phytin ist Hexaphosphorsäureester von Inosit. Sechs OH-Gruppen dieser hydroaromatischen Verbindung sind mit je einem Molekül Phosphorsäure verestert vorhanden. Das wasserlösliche, gut kristallisierte Natriumsalz des Phytins enthält nach Posternak (1919) 44 Moleküle Kristallwasser. Das kristallwasserfreie Salz hat die Zusammensetzung $C_6H_{12}O_{27}P_6Na_{12}$, die vielleicht in $C_6H_6O_{24}P_6Na_{12} + 3H_2O$ aufzulösen ist. In welcher Form die 3 Moleküle Wasser vorhanden sind, steht dahin. Das von Anderson (1920) hergestellte Bariumsalz des Phytins hat die Zusammensetzung $C_6H_{12}O_{24}P_6Ba_3$, die als das saure Bariumsalz der Inosithexaphosphorsäure anzusehen ist. Man kann also mit Recht

die 3 Moleküle Wasser im getrockneten Natriumsalz auch als Kristallwasser annehmen, die aber unter der versuchten Bedingung äusserst schwer auszutreiben sind. Shimoda (1927) hat kürzlich das saure Calciumsalz hergestellt und analysiert. Nach ihm ist die freie Phytinsäure Hexaphosphorsäureester des Inosits von der Zusammensetzung $C_6H_{18}O_{24}P_6$. Die von uns aufgeworfenen Fragen hinsichtlich der fermentativen Spaltung des Phytins waren erstens, ob diese Substanz wegen ihrer hochmolekularen Zusammensetzung für ihre Hydrolyse eines spezifischen Ferments bedarf, das von der die einfachen Ester spaltenden Phosphoesterase verschieden ist, oder ob seine 6 Moleküle Phosphorsäure immerhin so unabhängig von einander abgespalten zu werden imstande sind, wie es nach dem Verhalten der Diphosphorglycerinsäure oder Resoreindiphosphorsäure zu erwarten ist. Die Frage lautet also, ob die Komplexität der chemischen Konstitution überhaupt den Wirkungsbereich der Phosphoesterase bedingt. Die zweite Frage war, ob Inosit, ein hydroaromatischer Alkohol, als Baustein eines Esters die Anstellung einer spezifischen Phosphoesterase verlangt. Aus den bis heute veröffentlichten Angaben liess sich keine wesentliche Differenzierung der Phosphoesterase voraussehen. Die systematische Untersuchung von Asakawa (1929) hat auch gezeigt, dass die sämtlichen aliphatischen und aromatischen Esterphosphorsäuren, abgesehen von der regelmässig sich ändernden Inanspruchnahme der an der Fermentkinetik teilnehmenden Dissoziationsform, zu Phosphoesterase sich überhaupt gleich verhielten. Es kam dabei nicht darauf an, ob das Ferment von tierischer oder pflanzlicher Herkunft war. Wie wird sich nun die Sache bei Phytin verhalten? Die zweite Frage lautet also, ob die Arten der Alkoholreste in Esterphosphorsäuren eine spezifische Anstellung der Phosphoesterasen beanspruchen werden.

Das phytinspaltende Ferment wird gewöhnlich Phytase genannt. Dieses Ferment wurde zuerst von Suzuki, Yoshimura und Takahashi (1907) aus Reis- und Weizenkleie isoliert. Dox (1911) fand es in verschiedenen Aspergillusarten. Nach

McCollum und Hart (1908) soll das Ferment in Leber und Blut vorhanden sein, aber nicht in Muskel und Niere. Starkenstein (1911) hat die Phytase auch im Gehirn und Muskel bewiesen. Das Ph-Optimum wurde von Adler (1916) für Malzphytase als Ph 5,4 und von Shimoda (1927) für Phytase aus *Aspergillus oryzae* und *Mykoderma A Takahashi* als Ph 4,4 und für die aus *Pichia farinosa* als Ph 2,2 angegeben. Die bisher mitgeteilten Angaben haben jedoch nichts mit den von uns aufgeworfenen Fragen zu tun, mit Ausnahme des Experimentes von Plimmer (1913). Dieser Autor hat die enzymatische Hydrolyse des Phytins und der einfachen Phosphorsäureester mit einander verglichen und beobachtet, dass eine nennenswerte Spaltung des Phytins nur durch Kleienextrakt hervorgerufen werden konnten. Seine Versuchsbedingungen waren aber für uns ungenügend, wie aus dem Resultat des vorliegenden Experiments zu ersehen sein wird.

Unser Experiment war wie folgt:

Um die Phytase mit der Phosphoesterase zu vergleichen, haben wir zuerst Nieren-, Taka- und Reiskleienphosphatase auf Phytin wirken lassen. Diese drei sind die Vertreter der in der Natur vorkommenden Phosphoesterasen. Über das Takaferment sind die Angaben von Kobayashi (1927), Inouye (1928) und Asakawa (1929) zu erwähnen. Diese Phosphatase wirkt energisch in saurer Reaktion. Nierenferment kann aber nur in alkalischer Reaktion seine Wirkung zeigen. Inzwischen wurde im hiesigen Institut eine Phosphoesterase in tierischen Geweben nachgewiesen, die ihr Ph-Optimum in saurer Reaktion besitzt, obwohl ihre gemessene Aktivität gewöhnlich geringer als die des in alkalischer Reaktion wirksamen Ferments war. Das hat Kurata (1931) kürzlich angedeutet, und ihm gelang auch die Trennung der beiden Fermente. Man kann jedenfalls dem Takaferment gegenüber jenes Nierenferment, das sein Ph-Optimum in alkalischer Reaktion besitzt, als einen Vertreter der Phosphoesterasen aufstellen. Dazu kommt ein dritter Vertreter, das Reiskleienferment, welches, wie kürzlich von Uza-wa untersucht, alle Monophosphor-

säureester bei Ph 5.6 optimal hydrolysiert. Diese Eigenschaft der Reiskleienphosphoesterase ist darum besonders charakteristisch, weil einige Takadiastasenpräparate nach Reinigung durch Adsorptionsverfahren eine Esterasenlösung lieferten, die alle Monophosphorsäureester bei Ph 3.1 optimal aufspaltete. Im grossen und ganzen sind also Nieren-, Taka- und Reiskleienfermente als drei Vertreter der Phosphoesterasen zu betrachten.

Versuche mit jedem der Fermente wurden in einem von Ph 2 bis Ph 10 reichenden, umfangreichen Ph-Gebiet ausgeführt. Reiskleienferment greift Phytin an. Die Anwesenheit der sogenannten Phytase im Reiskleienextrakt wurde also bestätigt. Die beobachtete optimale Acidität war Ph 4.3 und bei dieser Acidität konnte 100%ige Abspaltung der Phosphorsäure konstatiert werden. Die gereinigte Takaphosphoesterase war dagegen auf Phytin unwirksam. Dieses Resultat war sehr auffallend, weil die angewandte Fermentlösung das Glycerophosphat sehr energisch zu zerlegen vermochte. Es zeigt, dass Phytin, Inosithexaphosphat, sich zur Phosphoesterase ganz anders als aliphatisches oder aromatisches Monophosphat verhält. Das abweichende Verhalten des Phytins war auch bemerkbar beim Versuch mit Nierenferment. Dieses Ferment ist, wie oben erwähnt, ein Gemisch aus 2 Arten Phosphoesterase, von denen die eine in Ph 9 und die andere in Ph 3.1 ihr Ph-Optimum besitzt. Phytin wurde durch dieses Ferment bei Ph 9 gar nicht angegriffen, wohl aber in saurer Reaktion. Die optimale Acidität war, wie bei Kleienferment, Ph 4.3. In 7 Tagen wurde bei dieser Acidität fast 100%ige Hydrolyse nachgewiesen. Es wurde weiter beobachtet, dass die Fermentlösungen aus Leber, Muskel und Knochen der Kaninchen bei Ph 4.3 in 5 Tagen das Phytin um 28%, 10% resp. 5% hydrolysierten.

Das fermentativ sonderbare Verhalten des Phytins scheint also in natürlicher Weise die Existenz des spezifischen Ferments, Phytase, annehmen zu lassen. Die Sache soll aber analytisch noch tiefer beleuchtet werden. Das vorliegende Experiment behandelt gerade diese Frage.

Die Spezifität des Ferments ist am ausgeprägtesten bei Carbohydrasen. Bei Proteasen wurde einmal angenommen, dass die synthetisch dargestellten Polypeptide ausschliesslich durch Erepsin angreifbar seien. Heute kennt man aber einige Polypeptide, die durch Trypsin oder Trypsin-Kinase aufspaltbar sind. Es kann ausserdem nicht geleugnet werden, dass ein den Wirkungsbereich der Proteasen bedingender Faktor die Arten der Aminosäuren sind, welche an dem Aufbau der betreffenden Polypeptide teilnehmen.

Man hat also Recht in unserem Fall das abweichende Verhalten des Phytins zuerst in dem hydroaromatischen Alkoholrest zu suchen. Um die Sache zu vereinfachen, wurde Cyclohexanolphosphorsäure als Bariumsalz hergestellt und der fermentativen Hydrolyse unterworfen. Diese Estersäure wurde durch Takaferment bei Ph 3.1 optimal gespalten; durch Reiskleienferment optimal bei Ph 5.6. Bei diesen zwei Phosphoesterasen war also kein besonderer Einfluss des Cyclohexanols als Substratkomponent zu bemerken. Als dann aber das Nierenferment auf dieses Substrat einwirkte, wurde eine sonderbare Beobachtung gemacht. In saurer Reaktion, zwischen Ph 2.3 und 6.8, wobei mit Glykokoll-HCl oder Acetat-Essigsäure gepuffert wurde, traten zwei Hydrolysenoptima auf. Sie waren Ph 3.1 und Ph 5.6 und zwischen diesen beiden Aciditäten fand sich eine minimale Hydrolyse. Ph 3.1 und 5.6 sind nun je eine Acidität, die man als Optimum bei Phosphoesterasen für verschiedene Ester nachgewiesen hat. Eine Erklärung für das Auftreten von zwei Optima kann vorläufig nicht gegeben werden. Aber als Sulfat vorher dem Hydrolysensystem zugesetzt war, verschwand das eine Optimum im Gebiet von Ph 3.1 vollständig, und die Spaltung der Cyclohexanolphosphorsäure in saurem Medium gipfelte nur bei Ph 5.6. In alkalischem Medium wurde die Spaltung auch durch die Art der Puffer stark beeinflusst. Mit Glykokoll-Natron versucht, kam eine maximale Hydrolyse bei Ph 8.2 zu Tage, die aber beim Versuch mit Borax-Borsäurepuffer gar nicht bemerkbar war.

Das Resultat bei Cyclohexanolphosphorsäure kann man also

zusammenfassend wie folgt deuten: Diese Säure wird durch Taka- und Kleienferment in gleicher Weise wie sonstige Monophosphorsäureester aufgespalten. Nierenferment kann sie sowohl in saurer als auch in alkalischer Reaktion angreifen. Eine wesentliche Verwandtschaft zwischen Phytin und Cyclohexanolphosphorsäure konnte also enzymatisch nicht anerkannt werden.

Da das Cyclohexanol als Komponent des Phosphorsäureesters keine Veränderung im Wirkungsbereich der Phosphoesterase herbeigeführt hatte, wurde der Gedanke weiter dahin gerichtet, wie der Monophosphorsäureester des hydroaromatischen Polyalkohols sich zum Ferment verhalten wird. Inositmonophosphat wurde daher synthetisch dargestellt. Die Fermentversuche ergaben, dass Inositmonophosphat in ganz analoger Weise wie Phytin enzymatisch zerlegbar war. Der Monoester konnte durch Takaphosphoesterase gar nicht gespalten werden, wogegen das Kleienferment auf ihn einwirkte. Das Optimum war bei Ph 5.6. Nierenferment übte in alkalischer Reaktion keine Hydrolyse aus, wie es auch bei Phytin der Fall war. Dieses Ferment griff aber den Monoester in saurem Medium an, und die optimale Acidität war Ph 3.1.

Versagen der Wirkung von sowohl Takaferment als auch der in alkalischer Reaktion wirkenden Nierenphosphoesterase einerseits und Hydrolysierbarkeit durch das Kleienferment und die in saurer Reaktion wirkende Nierenphosphoesterase andererseits stimmten also ganz gut mit der Beobachtung bei Phytin überein. Nur waren die beobachteten Ph-Optima bei den beiden Substanzen verschieden. Optimale Acidität der Phytinspaltung war bei Kleien- und Nierenfermenten Ph 4.3. Die der Inositphosphorsäurespaltung war bei Kleienferment Ph 5.6 und bei Nierenferment Ph 3.1. Die beiden letzten Aciditäten sind je das Ph-Optimum bei der Glycerophosphatspaltung durch die respektiven Fermente.

Bei den Phosphoesterasen nehmen wir an, dass das Ph-Optimum durch die Dissoziationskonstanten der Fermente und der Substrate bestimmt wird. Man weiss leider noch nichts von den Dissoziationskonstanten der Kleienphosphoesterase und desjenigen

Nierenfermentanteils, der in saurer Reaktion an der Spaltung der Esterphosphorsäure teilnimmt. Aber wenn man in Betracht zieht, dass die Pk_1 der Inositphosphorsäure als 1.4 und Pk_2 als 6.3 gemessen wurden, und dass diese Zahlen den von Kobayashi (1926) bei Glycerophosphorsäure beobachteten fast gleich sind, hat man wohl aus der Lage der optimalen Aciditäten die fragliche Dissoziationskonstante der betreffenden Fermente als Pk 4.8 anzunehmen. Es kommt nun die Dissoziationskonstante des Phytins in Frage. Wir wollten sie durch elektrometrische Titration ermitteln, aber an der Titrationskurve waren keine Wendepunkte zu finden, soweit 1 Mol phytinsaures Natrium mit 7 Mol Salzsäure titriert wurde. Das Dissoziationsverhalten der 6 Phosphorsäurereste im Phytinmolekül ist also nicht gleichartig, und die Grösse der einzelnen Dissoziationskonstanten ist schwer zu ermitteln.

Jedenfalls kann man ohne Zögern das gleiche Verhalten des Inositmonophosphats und des Phytins anerkennen. Die Abweichung, die diese beiden Substanzen den einfachen Monophosphorsäureestern gegenüber zeigten, muss also durch den spezifischen Bestandteil, Inosit, verursacht werden. Dieser Schluss leitet in natürlicher Weise zu der folgenden Annahme: Es kommt für die Spezifität der Phosphoesterase nicht darauf an, ob eine Polyoxyverbindung mit einem oder mehreren Phosphorsäuremolekülen verestert vorhanden ist. Nun ist es vielleicht nicht überflüssig danach zu fragen, ob die eigentümliche Bedeutung des Inosits ausschliesslich in seiner hydroaromatischen Natur zu suchen ist. Da man durch das oben erwähnte Resultat schon weiss, dass das Cyclohexanol als Alkoholrest des Esters enzymatisch sich nicht besonders anders als die sonstigen Alkohole verhält, muss als Vorbedingung des in Frage kommenden Verhaltens der hydroaromatische Kern mit der OH-Gruppe mehrfach substituiert vorhanden sein. Um dies tatsächlich zu beweisen, ist es erwünscht auszuschliessen, dass mehrfache Substitution einer organischen Verbindung mit den OH-Gruppen nicht einzig und allein zu der Spezialisierung des gebildeten Esters beiträgt. Der Versuch wurde daher mit Glukosemono-

phosphat angestellt. Dieses Experiment ist besonderes interessant, weil Glukose dieselbe Zusammensetzung wie das oft Cyclose genannte Inosit besitzt. Der Versuch ergab, dass Glukosephosphat fermentativ in gleicher Weise wie Glycerophosphat gespalten wird und als von Inositphosphat scharf getrennt zu betrachten ist. Es war nämlich durch Taka- und Kleienferment und sowohl in alkalischer als auch in saurer Reaktion durch Nierenferment zerlegbar, und zwar jene Ph-Optima zeigend, welche bei Glycerophosphat-spaltung für jedes Ferment beobachtet wurden.

Die wesentliche Sonderstellung des Phytins und der Inosit-monophosphorsäure wurde damit festgestellt. Für ihre Hydrolyse bedarf es einer spezifischen Phosphoesterase. Die Benennung Phytase für dieses Ferment mag aber beibehalten werden.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER SUBSTRATE.

A. *Phytin.*

Phytinsaures Natrium wurde unter Kombinierung der Verfahren von Anderson (1920) und Posternak (1919) wie folgt dargestellt: 1 kg Reiskleie wurde mit 4 Liter 2%iger Salzsäure 5 Stunden lang digeriert. Dann wurde durch Segeltuch gepresst und der Pressaft wiederholt filtriert, bis eine klare gelbliche Lösung erhalten wurde. Nachdem die freie Salzsäure durch Hinzufügung von 350 g Natriumacetat abgestumpft worden war, wurde die Lösung mit konzentrierter BaCl_2 -Lösung soweit versetzt, dass ein Niederschlag nicht mehr entstand. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Wasser wiederholt gewaschen, in Wasser suspendiert und durch Zugabe von Schwefelsäure in kleinem Überschuss zerlegt. Zu der von Bariumsulfat befreiten Lösung wurde gesättigte Kupferacetatlösung hinzugegeben und das ausgefällte weisse Kupfer-Salz, nach wiederholtem Waschen mit Wasser, in Wasser suspendiert und mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Das Kupfersulfid

Druck 0.0384 g Wasser, also 2 Moleküle Kristallwasser. 0.1569 g kristallwasserfreies Salz lieferte 0.1156 g BaSO₄. In dem Filtrat der Bariumbestimmung wurde der organische Phosphor nach Briggs colorimetrisch gemessen.

Für $C_8H_{11}PO_4Ba$ (315.4) ber. Ba 43.5%, P 9.83%,
gef. Ba 43.3%, P 9.72%.

C. *Inositmonophosphorsäure.*

Inosit wurde durch Hydrolyse des Phytins dargestellt. Der Firma Sankyo dankt unser Institut ergebenst für die freundliche Lieferung des Phytinnatriums. Da dieses Präparat nicht ganz rein war, wurde es nur für Inositdarstellung gebraucht.

250 g Phytin wurden mit 1 Liter 10%iger Schwefelsäure 6 Stunden im Autoklaven auf 150–160° erhitzt. Nach Abkühlung wurde die Schwefelsäure mit Calciumhydroxyd gegen Lakmus neutralisiert. Nach Filtration vom Calciumsulfat und Entfernung des überschüssigen Calciums durch CO₂ wurde die klare Lösung weiter mit Bariumhydroxyd versetzt, um sie von der Schwefelsäure zu befreien. Die abfiltrierte Lösung wurde wieder mit CO₂ behandelt, das klare Filtrat unter vermindertem Druck bis zu 200 ccm eingedampft und mit dem gleichen Volumen heissen Alkohols versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abgesaugt, mit heissem Alkohol gewaschen und aus 50%iger Essigsäure umkristallisiert. Dieses Inosit war aber noch nicht ganz rein. Darum wurde die Substanz in Wasser gelöst und bei ammoniakalischer Reaktion durch Bleiessig gefällt. Der Bleiniederschlag wurde in Wasser suspendiert und durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Die vom Bleisulfid abfiltrierte Lösung wurde unter vermindertem Druck eingedampft und mit warmem Alkohol soweit versetzt, bis die Kristallisation des Inosits begann. Nach 24 stündigem Stehenlassen wurden die Kristalle scharf abgesaugt und aus 50%iger Essigsäure umkristallisiert. Die schneeweissen rhombisch-prismatische Kristalle schmolzen bei 218° und enthielten 2 Moleküle Kristallwasser.

Die Phosphorierung des Inosits wurde nach demselben Verfahren ausgeführt, das Neuberg (1910) bei der Saccharomonophosphorsäuredarstellung angewandt hat. Aus 12 g Inosit konnten 7 g Calcium Inositmonophosphat erhalten werden. Die Substanz war leicht löslich in Wasser und frei von Chlor und anorganischem Phosphor.

0.2183 g Substanz wogen 0.2058 g nach dem Trocknen bei 100°C über P_2O_5 unter vermindertem Druck. Gewichtsverlust 0.0125 g. Sie enthielt also 1 Molekül Kristallwasser. Phosphorbestimmung an dem getrockneten Salz nach Neumann und Gregersen.

Für $C_6H_{11}O_9PCa$ (298.2)

berechnet: P 10.40%,

gefunden: P 10.25%.

D. Glukosemonophosphorsäure.

Calciumsalz dieser Zuckerestersäure wurde im hiesigen Institut nach Neuberg (1910) über Rohrzuckerphosphorsäure hergestellt.

II. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNGEN.

Nierenfermentlösung wurde nach Asakawa (1928) durch Autolyse der Schweineniere hergestellt. Sonstige tierische Fermentlösung, z.B. von Leber, Muskel oder Knochen, wurde in derselben Weise bereitet. Takaphosphoesterase nach Kobayashi-Inouye (1928). Reiskleienfermentlösung wurde nach Uzawa hergestellt. Genaue Angaben werden in Kürze von ihm gemacht werden. Das weitere Adsorptionsverfahren wurde bei mir nicht angewendet. Alle diese Fermentlösungen waren nach Dialyse praktisch frei von anorganischem oder als solchem autolytisch abspaltbaren Phosphor.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

Die Zusammensetzung der Versuchslösung war die ganze Experimente hindurch wie folgt:

M/100 Substratlösung	5 ccm
Puffergemisch	10 ccm
Destilliertes Wasser	10 ccm
Fermentlösung	25 ccm

Das Volumen machte 50 ccm aus, die endliche Substratkonzentration war daher M/1000. Die in den nachstehenden Protokollen angegebenen Zahlen geben den gemessenen anorganischen Phosphor in mg berechnet für 1 ccm der Versuchslösung an. Unter 100%iger Hydrolyse versteht man also 0.031 mg nachgewiesenen P bei Monophosphat und 0.186 mg bei Phytin, woraus die hydrolytischen Prozente berechnet wurden. Phosphor wurde colorimetrisch nach Briggs bestimmt.

Bariumcyclohexanolphosphat wurde beim Versuch in Kaliumsalz übergeführt. Da das Bariumsalz selbst in Wasser ziemlich schwer löslich ist, war die einfache Doppelumsetzung mit der berechneten Menge Kaliumsulfat für den Zweck nicht ausreichend. Ich habe darum 0.703 g Bariumsalz mit 40 ccm N/10 H_2SO_4 versetzt, unter bisweiligem Umrühren einige Stunden stehen gelassen, dann mit dem gleichen Volumen N/10 KOH versetzt und durch kleines Filterpapier in einen Messkolben von 200 ccm filtriert. Das Filterpapier wurde einige Male mit Wasser ausgewaschen, wobei die Waschflüssigkeit direkt in denselben Kolben aufgenommen wurde. Dann folgte die Auffüllung des Kolbens mit Wasser bis zur Marke.

Pufferlösungen waren Essigsäure-Acetat (M/2), Glykokoll-Salzsäure (M/10), Glykokoll-Natron (M/10) und Borax-Borsäure nach Palitzsch. Die gebrauchten Pufferarten sind aus den Protokollen ersichtlich. Ph elektrometrisch gleich nach Anstellung der Versuche. Die Fermentversuche wurden bei 37° im elektrisch regulierten Wasserbad ausgeführt. Wenn sie über 10 Stunden dauerten, wurden die Versuchskolben bei 37° in den Brutschrank gestellt. Toluolzusatz als Antisepticum.

IV. ERGEBNISSE.

A. Prüfung der Fermentlösung auf Glycerophosphat.

TABELLE I. Reiskleuferment + Glycerophosphat.

Ph		3.1	4.8	5.0	5.6	6.8
Stunde						
1	0.0048 mg	0.0074 "	0.0086 "	0.0104 "	0.0046 "	
	15.5 %	23.8 "	27.7 "	33.6 "	14.8 "	
3	0.0083 mg	0.0112 "	0.0126 "	0.0176 "	0.0071 "	
	26.7 %	36.2 "	40.6 "	56.8 "	22.9 "	
24	0.0181 mg	0.0234 "	0.0245 "	0.0286 "	0.0144 "	
	58.4 %	75.5 "	79.0 "	92.3 "	46.4 "	
Pufferarten	Essigsäure-Acetat	"	"	"	"	

TABELLE II. Takaferment + Glycerophosphat

Ph		3.1	3.7	4.0	4.4	4.9	5.2	5.6	7.3
Stunde									
1	0.00323 mg	0.0150 "	0.0115 "	0.0100 "	0.00881 "	0.00408 "	0.00347 "	0.00249 "	0.00033 "
	10.4 %	48.4 "	36.4 "	32.4 "	28.7 "	13.2 "	11.2 "	8.4 "	2.2 "
2	0.00584 mg	0.0264 "	0.0218 "	0.0198 "	0.0137 "	0.00762 "	0.00693 "	0.00515 "	0.00202 "
	18.8 %	85.2 "	70.5 "	63.8 "	44.1 "	24.5 "	22.3 "	16.6 "	6.5 "
Pufferarten		Essigsäure-Acetat	"	"	"	"	"	"	"

TABELLE III. Nierenferment + Glycerophosphat.

Ph Stunde	2.6	3.1	4.4	5.6	6.5	8.2	8.9	9.3	10.1
1	0.0133 mg 43.0 %	0.0182 " 58.6 "	0.00899 " 29.0 "	0.00800 " 26.0 "	0.00533 " 17.2 "	0.00762 " 24.6 "	0.0163 " 52.7 "	0.0204 " 65.8 "	0.0169 " 54.4 "
2	0.0191 mg 61.4 %	0.0222 " 71.7 "	0.0124 " 39.9 "	0.0112 " 36.2 "	0.00714 " 23.0 "	0.0121 " 39.6 "	0.0209 " 67.5 "	0.0258 " 83.3 "	0.0220 " 70.9 "
Pufferarten	Glykokoll- HCl	Essigsäure- Acetat	"	"	"	Glyko- koll- Natron	"	"	"

TABELLE IV. Leberferment + Glycerophosphat.

Ph Stunde	3.1	4.0	5.0	5.6	6.8	8.2	8.9	9.3	10.1	12.4
1	0.00380 mg 12.5 %	0.00308 " 9.9 "	0.00296 " 9.5 "	0.00293 " 9.4 "	0.00258 " 8.3 "	0.00421 " 13.6 "	0.00364 " 21.4 "	0.0113 " 36.2 "	0.0191 " 61.5 "	0.00702 " 22.6 "
2	0.00316 mg 19.8 %	0.0050 " 16.1 "	0.0047 " 15.2 "	0.0047 " 15.2 "	0.00436 " 14.1 "	0.00350 " 16.1 "	0.00223 " 29.8 "	0.0160 " 51.6 "	0.0263 " 84.8 "	0.0080 " 25.8 "
24	0.01065 mg 34.4 %	0.0098 " 31.6 "	0.0096 " 30.9 "	0.00903 " 29.2 "	0.00573 " 28.1 "	0.01066 " 34.4 "	0.0208 " 67.2 "	0.0292 " 94.3 "	0.0308 " 99.5 "	0.00968 " 31.2 "
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	Glyko- koll- Natron	"	"	"	"

B. Hydrolyse des Phytins.

TABELLE I. Reiskeleferment + Phytin.

Ph Tage	3.1	4.1	4.3	4.5	4.6	4.7	5.1	8.2	9.1
1	0	0.0084 4.5 mg %	0.0090 4.8 "	0.0078 4.2 "	0.0071 3.8 "	0.0064 3.4 "	0.0053 2.9 "	0	0
3	0	0.0182 9.8 mg %	0.0219 12.8 "	0.0202 11.9 "	0.0175 9.4 "	0.0149 8.0 "	0.0133 7.2 "	0	0
5	0.0038 2.0 mg %	0.0300 16.1 "	0.0391 21.0 "	0.0357 19.2 "	0.0290 15.6 "	0.0243 13.1 "	0.0233 12.0 "	0	0
17	0.0051 2.7 mg %	0.109 58.6 "	0.124 66.7 "	0.118 62.9 "	0.111 59.8 "	0.098 52.7 "	0.088 47.3 "	0	0
24	0.0059 3.1 mg %	0.150 80.7 "	0.171 91.9 "	0.155 83.3 "	0.145 78.2 "	0.129 69.4 "	0.108 58.1 "	0	0
30	0.0068 3.6 mg %	0.161 86.6 "	0.188 101.0 "	0.171 91.9 "	0.156 83.9 "	0.138 74.2 "	0.119 64.0 "	0	0
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	"	"	Glykokoll- Natron	"

TABELLE II. Takaferment + Phytin.

Tage	Ph									
	3.1	4.5	4.8	5.6	7.3	8.6	9.1	9.3	9.7	10.1
1. 2. 3. 5. 15 und 26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	Glyko- koll- Natron	"	"	"	"

TABELLE III. Nierenferment + Phytin.

Tage		Ph	3.2	4.3	4.7	5.7	8.2	9.1
1	0.0099 mg		0.0416	"	0.0294	0.0152	0	0
	5.3 %		22.4	"	15.8	8.2		
3	0.0261 mg		0.107	"	0.0625	0.0400	0	0
	14.0 %		57.8	"	33.6	21.5		
5	0.0412 mg		0.145	"	0.0915	0.0536	0	0
	22.1 %		76.7	"	49.1	30.4		
7	0.0527 mg		0.179	"				
	28.3 %		96.5	"				
Pufferarten	Essigsäure- Acetat		"		"	"	Glykokoll- Natrium	"

TABELLE IV. Leberferment + Phytin.

Ph		3.2	4.3	4.7	5.7	8.2	9.1
Tage							
1		0.0045 mg 2.4 %	0.0158 8.5 "	0.0081 4.3 "	0.0037 1.9 "	0	0
3		0.0086 mg 4.6 %	0.0321 17.2 "	0.0177 9.6 "	0.0047 2.5 "	0	0
5		0.0154 mg 8.3 %	0.0516 27.8 "	0.0318 17.1 "	0.0058 3.1 "	0	0
Pufferarten		Essigsäure- Acetat	"	"	"	Glykoll- Natrium	"

TABELLE V. Muskelferment + Phytin.

Ph		3.2	4.3	4.7	5.7	8.2	9.1
Tage							
1		0	0.0063 3.3 %	0.0044 2.4 "	0	0	0
3		0	0.0142 7.6 %	0.0081 4.3 "	0	0	0
5		0	0.0191 10.2 %	0.0125 6.6 "	0	0	0
Pufferarten		Essigsäure- Acetat	"	"	"	Glykokoll- Natrium	"

TABELLE VI. Knochenferment + Phytin.

Ph Tage	3.1	4.3	4.7	5.7	8.2	9.1
1	0	0.0033 mg 1.7 %	0.0026 1.4	0	0	0
3	0	0.0033 mg 3.3 %	0.0045 2.4	0	0	0
5	0	0.0089 mg 4.8 %	0.0053 3.3	0	0	0
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	Glykokoll- Natron	"

C. Hydrolyse des Cyclohexanolphosphats.

TABELLE I. Reiskleienferment + Cyclohexanolphosphat.

Ph Stunden	2.9	3.1	4.0	4.6	5.6	6.2	7.2
1	0.00820 mg 20.0 %	0.00755 24.3	0.0136 43.9	0.0141 45.7	0.0163 52.7	0.0141 45.2	0.0130 42.0
2	0.0106 mg 30.9 %	0.0160 51.8	0.0222 71.8	0.0273 88.0	0.0322 103.0	0.0127 87.3	0.0240 77.7
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	"	"

TABELLE IIIb. Nierenferment + Cyclohexanolphosphat.

Ph Stunden	7.1	7.4	7.6	7.8	8.1	8.2	8.6	9.2
1	0.0114 mg	0.00975 "	0.00904 "	0.00801 "	0.00753 "	0.00690 "	0.00531 "	0.00500 "
	36.8 %	61.4 "	29.2 "	25.8 "	24.1 "	22.2 "	17.2 "	16.1 "
1	0.0186 mg	0.0139 "	0.0129 "	0.0116 "	0.00945 "	0.00738 "	0.00590 "	0.00572 "
	60.2 %	44.7 "	41.8 "	37.3 "	30.4 "	23.8 "	18.7 "	18.4 "
Pufferarten	Borax- Borsäure	"	"	"	"	"	"	"

TABELLE IIIc. Nierenferment + Cyclohexanolphosphat.

Ph Stunden	8.2	8.8	9.3	10.1
1	0.0210 mg	0.0101 "	0.00523 "	0
	67.7 %	32.7 "	16.8 "	
2	0.0276 mg	0.0160 "	0.00593 "	0
	87.9 %	51.6 "	19.1 "	
Pufferarten	Glykokoll- Natron	"	"	"

TABELLE IIId. Nierenferment + Cyclohexanolphosphat.

M/100 Cyclohexanolphosphat	5 cem
M/2 Acetatgemisch	5 cem
0.1% NaF oder 1.0% K ₂ SO ₄	10 cem
Nierenferment	25 cem

bei Na F-Zusatz				bei K ₂ SO ₄ -Zusatz		
Ph Stunden	3.3	4.3	5.6	3.3	4.3	5.6
1	0	0	0	0.0055 mg 17.7 %	0.0080 " 25.8 "	0.0155 " 50.0 "
2	0	0	0	0.0083 mg 26.8 %	0.0133 " 42.9 "	0.0211 " 68.0 "
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	Essigsäure- Acetat	"	"

D. Hydrolyse des Inositmonophosphats.

TABELLE I. Reiskleienferment + Inositmonophosphat.

Ph Tage	3.1	4.0	5.0	5.6	6.8
1	0.00159 mg 5.1 %	0.00498 " 16.1 "	0.00829 " 26.7 "	0.00969 " 31.3 "	0.00624 " 20.1 "
2	0.00227 mg 7.3 %	0.00795 " 25.6 "	0.0120 " 38.8 "	0.0137 " 44.2 "	0.00839 " 27.1 "
3	0.00289 mg 9.3 %	0.00995 " 32.1 "	0.0153 " 49.3 "	0.0175 " 56.4 "	0.0113 " 36.3 "
10	0.00456 mg 14.7 %	0.0169 " 54.7 "	0.0252 " 81.2 "	0.0269 " 87.0 "	0.0172 " 55.3 "
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"

TABELLE II. Takaferment + Inositmonophosphat.

Ph Tage	3.1	4.0	5.0	5.6	6.8
1, 3, 5 und 7	0	0	0	0	0
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"

TABELLE III. Nierenferment + Inositmonophosphat.

Tage	Ph		3.1	4.0	5.0	5.6	6.8	8.2	9.3
1			0.0141 mg	0.0104	"	0.00373	"	0	0
			45.6 %	32.1	"	21.7	"		
2			0.0195 mg	0.0165	"	0.0133	"	0	0
			62.8 %	51.2	"	43.0	"		
3			0.0231 mg	0.0198	"	0.0175	"	0	0
			74.5 %	63.8	"	56.3	"		
5			0.0271 mg	0.0233	"	0.0203	"	0	0
			87.4 %	75.0	"	65.5	"		
Pufferarten			Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	Glykokoll- Natrium	"

E. Hydrolyse des Glukosemonophosphats.

TABELLE I. Reiskloienferment + Glukosemonophosphat.

Ph Stunden	3.1	3.7	4.1	4.3	4.6	5.0	5.6	6.8
5	0.00216 mg	0.00381	0.00412	0.00444	0.00461	0.00500	0.00596	0.00267 "
	6.9 %	12.3	12.9	14.3	14.9	16.1	19.3	8.6 "
24	0.00457 mg	0.0103	0.0109	0.0117	0.0124	0.0131	0.0150	0.00571 "
	14.7 %	33.0	35.3	37.8	40.0	42.4	48.4	18.4 "
48	0.00696 mg	0.0159	0.0170	0.0175	0.0189	0.0196	0.0221	0.00766 "
	22.4 %	51.4	54.9	56.4	61.3	63.3	71.3	24.7 "
120	0.00962 mg	0.0222	0.0229	0.0235	0.0248	0.0264	0.0289	0.0102 "
	31.0 %	71.6	73.9	75.9	79.9	85.0	93.3	32.9 "
Pufferarten	Essigsäure- Acetat	"	"	"	"	"	"	"

TABELLE II. Takaferment + Glukosemonophosphat.

Stunden	Ph	3.1	4.0	5.0	5.6	6.8
1		0.00545 mg	0.00286 "	0.00249 "	0.00221 "	0
		17.6 %	9.2 "	8.0 "	7.1 "	
5		0.0121 mg	0.00993 "	0.00976 "	0.00797 "	0.00381 "
		39.1 %	32.1 "	31.5 "	25.7 "	12.3 "
24		0.0216 mg	0.0165 "	0.0148 "	0.0126 "	0.00593 "
		68.2 %	53.3 "	47.7 "	40.7 "	19.1 "
72		0.0275 mg	0.0216 "	0.0203 "	0.0166 "	0.00721 "
		88.6 %	69.6 "	65.4 "	53.7 "	23.2 "
Pufferarten		Essigsäure-Acetat	"	"	"	"

TABELLE III. Nierenferment + Glukosemonophosphat.

Ph Stunden	2.3	2.6	3.1	4.0	4.3	5.0	5.6	6.8	8.2	10.1	9.3	11.3
1	—	—	0.0109 mg	0.00980 31.6	0.00840 27.2	0.00778 24.4	0.00512 16.5	0.00296 9.6	0.00532 17.1	0.00689 22.2	—	—
			35.2 %	"	"	"	"	"	"	"	"	"
5	0.0128 mg 41.4	0.0138 " 44.5 "	0.0190 61.4	0.0156 50.4	0.0143 46.2	0.0129 41.4	0.0080 25.8	0.00525 16.9	0.00868 28.0	0.0120 38.7	0.00612 19.7	0.00274 8.8
			"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
24	0.0157 mg 50.5	0.0165 " 53.3 "	0.0238 76.8	0.0210 67.8	0.0191 61.4	0.0168 54.2	0.0121 39.1	0.00727 23.4	0.0114 36.4	0.0171 55.3	0.0100 32.3	0.00368 11.9
			"	"	"	"	"	"	"	"	"	"
48			0.0266 mg	0.0244 78.6	0.0219 70.8	0.0193 62.1	0.0155 50.2	0.00842 27.2	0.0131 42.1	0.0205 66.9		
			85.9 %	"	"	"	"	"	"	"	"	"
Puffer- arten	Glyko- koll- HCl	"	Essig- säure- Acetat	"	"	"	"	"	Glyko- koll- Natron	"	"	"

LITERATUR.

- Adler, L. (1916): *Biochem. Zeitschr.*, **75**, 319.
Anderson, R. J. (1920): *Journ. of Biol. Chem.*, **44**, 429.
Asakawa, K. (1928): *Journ. of Biochem.*, **10**, 157.
Asakawa, K. (1929): *Journ. of Biochem.*, **11**, 143.
Dox, A. W. und Golden, R. (1911): *Journ. of Biol. Chem.*, **10**, 183.
Inouye, K. (1928): *Journ. of Biochem.*, **10**, 133.
Kobayashi, H. (1927): *Journ. of Biochem.*, **8**, 205.
Kobayashi, K. (1929): *Journ. of Biochem.*, **11**, 175.
Kurata, K. (1931): *Journ. of Biochem.*, **14**, 25.
McCollum, E. V. und Hart, E. B. (1908): *Journ. of Biol. Chem.*, **4**, 497.
Neuberg, C. und Pollak, H. (1910): *Biochem. Zeitschr.*, **23**, 515.
Neuberg, C. und Pollak, H. (1910): *Biochem. Zeitschr.*, **26**, 514.
Plimmer, A. R. (1913): *Biochem. Journ.*, **7**, 43.
Posternak, S. (1919): *Compt. rend. Acad.*, **169**, 138.
Shimoda, C. (1927): *Centralbl. für Bakteriöl., Parasitenk. und Infektionskr.*,
II Abt., **71**, 232.
Suzuki, U., Yoshimura, K. und Takahashi, M. (1907): *Bull. Coll.*
Agr. Tokio, **7**, 495.
Starkenstein, E. (1911): *Biochem. Zeitschr.*, **30**, 56.

ÜBER DIE FERMENTATIVE HYDROLYSE DER VERSCHIEDENEN PHOSPHORSÄUREESTER UND DIE SPONTANE HYDROLYSE DER PHOSPHOSALICYLSÄURE.

VON

CHOICHIRO MANAKA.

*(Aus dem Medizinisch-chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. Dr. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 25. April, 1931)

Im hiesigen Institut wurde seit einiger Zeit die Differenzierung der Phosphatase und ihre Beeinflussbarkeit durch die chemische Konstitution der Substrate studiert.

Kurata (1931) konnte kürzlich die Pyrophosphatase von der Phosphoesterase trennen, welche beiden bisher unter der allgemeinen Benennung Phosphatase zusammenfasst wurden.

Ihm gelang auch nachzuweisen, dass Diphenylpyrophosphorsäure zuerst unter Beteiligung eines Aktivators durch Pyrophosphatase in 2 Moleküle Phenylphosphorsäure gespalten wird, und dass dann auf diese freie Phenylphosphorsäure die Phosphoesterase einwirkt und sie in Phenol und Orthophosphorsäure zerlegt.

Hinsichtlich der Spezifität der Phosphoesterase ist die Mitteilung von Horiuchi (1931) interessant. Er fand bei fermentativer Forschung über Phytinhydrolyse, dass Inositmonophosphorsäure, die mit Phytin gemeinsam hydroaromatischen Polyalkohol enthält, den aliphatischen oder aromatischen Phosphorsäureestern gegenüber ein ganz besonderes Verhalten zu Phosphoesterasen zeigte.

Inositphosphorsäureester wurde weder von Takaferment noch von der in alkalischer Reaktion optimal wirkenden Nierenphosphoesterase angegriffen, wohl aber von Reiskleienferment.

Die Spezifität der Phosphoesterase wird also von dem an dem Aufbau des Esters teilnehmenden Alkoholrest bedingt.

Den Einfluss der chemischen Konstitution der Phosphorsäureester auf die Lage der Hydrolysen-Ph-Optima hat schon früher Asakawa (1929) unter Leitung von Prof. Akamatsu untersucht.

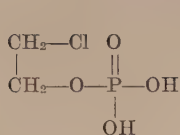
Das Verhältnis war bei Takaferment vor allem auffallend. Die Monophosphorsäureester, die durch dieses Ferment aufspaltbar sind, können in zwei Gruppen eingeteilt werden:

Die der ersten Gruppe werden optimal bei Ph 3.1 hydrolysiert, dagegen die der zweiten bei Ph 5.5. Chemisch strukturell betrachtet, haben die Alkoholreste der zur ersten Gruppe gehörenden Ester die folgenden Merkmale: Bei den aliphatischen Alkoholen ist die veresterte OH-Gruppe in Form von sekundärem Alkohol vorhanden. Phenolarten, die ihr OH in direkter Bindung am Benzolkern enthalten, liefern immer Phosphorsäureester der ersten Gruppe.

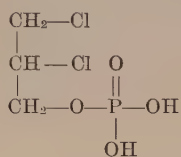
Der zweiten Gruppe gehören dagegen ausschliesslich diejenigen aliphatischen Ester an, bei welchen die mit Phosphorsäure veresterte OH-Gruppe der Alkoholreste in Form von primärem Alkohol vorhanden ist. Wenn man aber am aliphatischen primären Alkohol eine Phenylgruppe in seinen Alkylrest einführt, wird der abgeleitete Ester, z.B. Phenäthylphosphorsäure, der ersten Gruppe zugehörig.

In vorliegender Mitteilung werden die fortgesetzten Studien über die Beziehung der chemischen Konstitution der Phosphorsäureester zu ihrer fermentativen Zerlegbarkeit veröffentlicht.

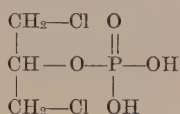
Für die Experiment hat der Verfasser die folgenden Ester dargestellt: nämlich Chloräthylphosphorsäure (I), α , β -Dichlorpropylphosphorsäure (II), α , α' -Dichlorisopropylphosphorsäure (III), Brenzkatechinmonophosphorsäure (IV), Resorcinmonophosphorsäure (V), Hydrochinonmonophosphorsäure (VI), Resorcin-diphosphorsäure (VII), o-Carboxyphenylphosphorsäure oder Phosphosalicylsäure (VIII), m-Carboxyphenylphosphorsäure (IX), und p-Carboxyphenylphosphorsäure (X).



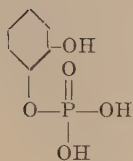
(I)



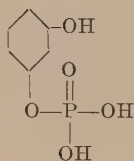
(II)



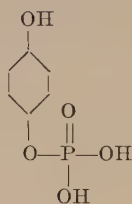
(III)



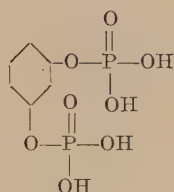
(IV)



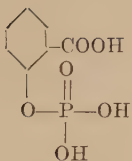
(V)



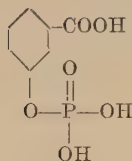
(VI)



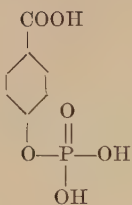
(VII)



(VIII)



(IX)



(X)

Chloräthylphosphorsäure wurde zuerst von Langheld (1911) durch Erwärmen von Metaphosphorsäureäthylester mit überschüssigem Äthylenchlorhydrin und Neutralisation des Reaktionsgemisches mit Baryt als Bariumsalz mit 1 Molekül Kristallwasser erhalten.

Fischer und Pfähler (1920) haben die Bildung jener Säure anstatt der Glykolphosphorsäure beobachtet, als sie Phosphoroxychlorid auf Glykol in Pyridin einwirken liessen. Das Bariumsalz enthielt nach diesen Autoren 3 Moleküle Kristallwasser.

Henry, Plimmer und Burch (1929) haben später dieselbe Säure durch direkte Einwirkung von Phosphoroxychlorid in Pyridin auf Äthylenchlorhydrin erhalten. Wir konnten dieselbe Säure durch weit einfacheres Verfahren herstellen. Es beruht auf der Wirkung eines Gemisches aus 1 Mol Phosphorpentoxyd und 1 Mol Phosphorsäure auf 3 Mol Äthylenchlorhydrin. Die Reaktionsmasse wird in Wasser gelöst und nach Neutralisation mit Baryt und Entfernung des überschüssigen Bariums mit Alkohol versetzt. Das Bariumsalz fällt gleich in schön ausgebildeten Kristallen aus.

Dieses Verfahren konnte mit gutem Erfolg bei der Phosphorierung der verschiedenen Alkohole angewandt werden.

Die sonstigen Phosphorsäureester II–VI wurden in derselben Weise durch Phosphorierung der betreffenden Alkohole mit dem Gemisch von Phosphorpentoxyd und Phosphorsäure hergestellt.

Über diese Monophosphorsäureester wurden in der Literatur bisher keine Angaben gemacht. Resoreindiphosphorsäure (VII) wurde schon früher als ihr Säurechlorid von Kanauer (1894) hergestellt.

Nach seiner Angabe war die betreffende freie Säure labil in wässriger Lösung. Ich konnte aber die freie Säure in gut kristallisiertem Zustande aus dem Resoreindioxychlorhydrin herstellen, indem das Säurechlorid, in Benzol gelöst, mit einer berechneten Menge Wasser versetzt wurde. Die Resoreindiphosphorsäure ist stabil, sogar kochbeständig.

Meta- und Paracarboxyphenylphosphorsäuren (IX und X) wurden schon früher von Anschütz und Moore (1887) hergestellt. Diese beiden Säuren sind, wie die Autoren angaben, beständig in wässriger Lösung. Die Orthocarboxyphenylphosphorsäure, die nach der Angabe von Anschütz und Emery (1885) hergestellt werden konnte, war aber labil. Ihre frisch

dargestellte wässrige Lösung zeigte kolorimetrisch keine freie Orthophosphorsäure, die aber beim Aufbewahren der Lösung auftrat und sich immer vermehrte.

Wir haben unsere Aufmerksamkeit auf die Unbeständigkeit der Orthocarboxyphenylphosphorsäure gerichtet und den Einfluss der Wasserstoffzahl des Mediums auf die spontane Hydrolyse dieser Säure zuerst untersucht. Das Resultat war sehr auffallend:

Die Phosphosalicylsäure ist bei Ph 5.5 höchst unbeständig.

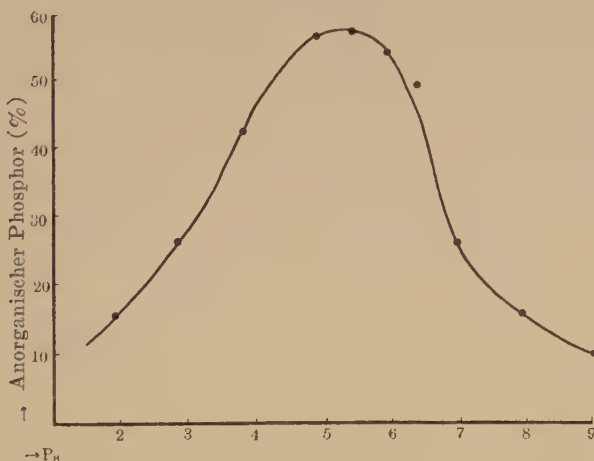
Je mehr die Acidität des Mediums von diesem Ph abweicht, desto mehr vermindert sich die Labilität der betreffenden Säure.

Mit M/1000 wässriger Lösung bei 37° untersucht, wurde bei Ph 5.5 in 3 Stunden 56.5%ige Hydrolyse beobachtet, dagegen betrug die Hydrolyse bei Ph 2.0 und 9.0 in demselben Zeitraum nur um 15 resp. 10%.

Die Abhängigkeit der Labilität der Phosphosalicylsäure von der Acidität des Mediums ist klar aus der nachstehenden Figur 1 ersichtlich.

Es ist nun in der Chemie allgemein anerkannt, dass die hydrolytische Zerlegung der zusammengesetzten Verbindungen durch H

Fig. 1.



oder OH Ionen katalysiert wird; je reichlicher die H oder OH Ionen vorhanden sind, desto mehr wird die Hydrolyse beschleunigt.

Bei Phosphosalicylsäure ist es aber ganz anders. Die optimale Acidität der spontanen Hydrolyse ist Ph 5.5, und die gesteigerte H oder OH-Ionenkonzentration hemmt im Gegenteil die Hydrolyse.

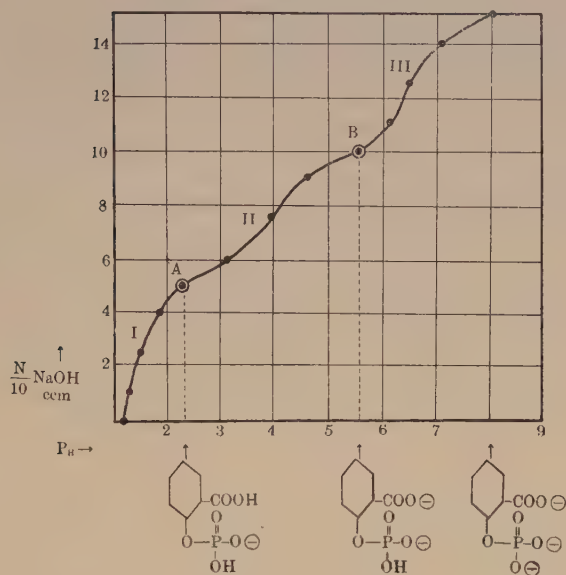
Dieses Verhalten der Phosphosalicylsäure ist besonders interessant, weil man weiss, dass die fermentative Spaltung bei einer für jeden biologischen Katalysator spezifischen Acidität am schnellsten fortschreitet.

Um das Wesen der Fermentwirkung aufzuklären, wurde die Labilität der fermentativen Substrate, z.B. der Polypeptide und anderer, von einigen Autoren untersucht, aber ohne merkliche Erfolge. Nur die Angabe von Bergmann und seinen Mitarbeitern (1925) ist sehr wertvoll. Sie haben beobachtet, dass O-Benzoylserinmethylesterchlorhydrat seine NH_2 -Gruppe hydrolytisch abspalten kann, wenn es mit einer äquivalenten Menge Alkali neutralisiert wird, während es bei Zusatz von überschüssigem Alkali nur in das N-Benzoylserin umgewandelt wird. Die Acidität des Mediums sollte sicherlich einen Einfluss auf den Betrag dieser hydrolytischen Desaminierung ausüben. Genaue Angaben wurden aber nicht gemacht.

Wir wollten bei Phosphosalicylsäure versuchen, in welchem Dissoziationszustand überhaupt diese Säure bei Ph 5.5 sich befindet, wo sie spontan am schnellsten aufgespalten wird.

Die Dissoziationskurve dieser Säure wurde daher elektrometrisch ermittelt. Figur 2 zeigt die erhaltene Kurve. Man kann an der Figur ersehen, dass die Kurve aus 3 Abschnitten I, II und III besteht. Der Wendepunkt des III. Kurvenabschnittes entspricht an der Abszisse Ph 6.6. Wenn man in Betracht zieht, dass diese Acidität bei Neutralisation der dreibasischen Phosphosalicylsäure mit $2\frac{1}{2}$ Mol Alkali gezeigt wurde, und dass die zweite Dissoziationskonstante der Phosphorsäure Pk_2 6.8 ist, kann der III. Kurvenabschnitt ohne Zweifel als die zweitstufige Dissoziationskurve des Phosphorsäurerests angenommen werden.

Fig. 2.



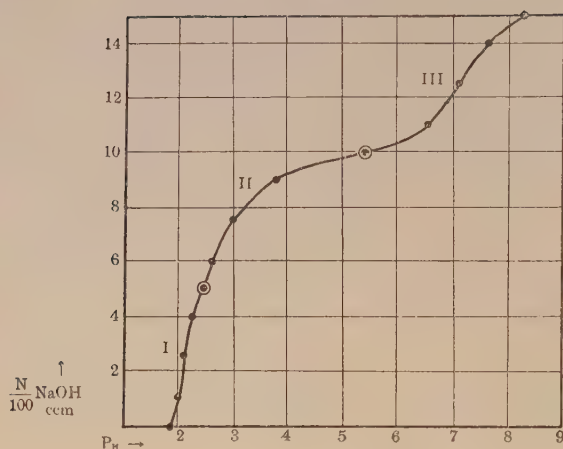
Der I. Kurvenabschnitt gehört zu der Titrationskurve der starken Säuren. Aus Erfahrung kann man diesen Kurvenanteil auf die erststufige Dissoziation des Phosphorsäurerests beziehen.

Der zweite Kurvenabschnitt gehört also zu dem Salicylsäurerest. Der Wendepunkt entspricht auf der Abszisse Ph 4. P_k des Salicylsäurerests ist darum als 4 anzunehmen. Dissoziationskonstante der freien Salicylsäure ist 10^{-3} . P_k der Salicylsäure wird also durch Bindung mit Phosphorsäure um eins vergrößert.

Das Verhältnis ist noch klarer ersichtlich, wenn man die Dissoziationskurve der Phosphosalicylsäure und die eines äquivalenten Gemisches aus Salicylsäure und Phosphorsäure miteinander vergleicht. Hier besteht die Kurve wieder aus drei Abschnitten. Der mittlere ist ohne Zweifel die Titrationskurve der Salicylsäure. P_k ist 3.

Bei Ph 2.3 (Punkt A der Fig. 2) ist die Phosphosalicylsäure

Fig. 3.



an ihrem Phosphorsäurerest erststufig dissoziiert vorhanden. Bei Ph 8 (Punkt C der Fig. 2) dissoziiert die Säure total an allen Säuregruppen. Bei Ph 5.6 besitzt die Säure eine solche elektrochemische Form, dass die Dissoziation des Phosphorsäurerests für die erste Stufe und die des Salicylsäurerests vollständig sind, während das zweite Säureradikal des Phosphorsäurerests undissoziiert bleibt. Diese Acidität, Ph 5.6, ist in der Tat eben die, welche die maximale Labilität der Phosphosalicylsäure bedingt. Man weiss anderseits, dass die Phosphorsäureester des Phenols, Orthokresols, Brenzkatechins und sogar der m- oder p-Oxybenzoesäure sehr stabil sind. Die Unbeständigkeit der Phosphosalicylsäure muss also durch die in Orthostellung vorhandene Carboxylgruppe hervorgerufen werden. Eine theoretische Erklärung möchten wir uns jedoch vorläufig vorbehalten. Auf Grund der Kinetik der Phosphoesterasen sind wir aber der Meinung, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Esterhydrolyse von dem Multiplikationsproduct aus der Konzentration entweder der undissoziierten Fermentmoleküle und der Substrationen, oder der Fermentationen und der undissoziierten Substratmoleküle abhängt. Das hat schon

Asakawa (1929) angegeben. Die gemessenen optimalen Aciditäten stimmten mit den berechneten gut überein.

Bei Phosphosalicylsäure war ihre Labilität, wie erwähnt, am grössten, als der Phosphorsäurerest für ihre zweite Dissoziationstufe undissoziiert vorhanden war. Die spontane Zerlegung wird also einerseits durch den Dissoziationszustand des abzusplittenden Phosphorsäurerests und andererseits durch den Dissoziationszustand des die Labilität verursachenden Säureradikals bestimmt.

Dieser Schluss ist im Zusammenhang mit unserer Annahme über Phosphoesterasenkinetik als sehr wichtig zu erwähnen.

Die Ergebnisse der fermentativen Hydrolyse der oben erwähnten Phosphorsäureester sind wie folgt, wobei nur die Phosphosalicylsäure wurde, wegen ihrer Unbeständigkeit, als Versuchssubstrat nicht gebraucht: Die nach Kobayashi-Inouye gereinigte Taka-phosphoesterase wurde zuerst auf β -Glycerophosphat, Acetonglycerophosphat und Propylphosphat geprüft. Das erste Substrat gehört nach der Angabe von Asakawa zu der ersten Gruppe und soll durch Takaferment optimal bei Ph 3.1 aufgespalten werden. Die zwei letzteren sind dagegen Ester der zweiten Gruppe und sollen durch dasselbe Ferment optimal bei Ph 5.6 zerlegt werden.

Der Versuch ergab, dass das Ferment die Ester, sei es von der ersten oder der zweiten Gruppe, bei Ph 3.1 optimal spaltete.

Diese Fermentlösung hat auch alle anderen Phosphorsäureester, die in den vorliegenden Experimenten untersucht wurden, am energischsten bei Ph 3.1 hydrolysiert. Dies war zuerst sehr überraschend, da wir die von Asakawa und Kobayashi (1929) früher veröffentlichten Angaben nicht bestätigen konnten. Es wurde aber bald dadurch erklärt, dass die Abweichung durch die Arten des Handelspräparats verursacht wurde: die Fermentlösung, die aus dem ein Jahr vorher bezogenen Präparat durch Adsorptionsverfahren hergestellt wurde, verhielt sich zu jeder Gruppe von Phosphorsäureestern ganz spezifisch, entsprechend der Angabe von Kobayashi und Asakawa, obwohl die Ferment-Aktivität weit geringer war als die der früher erworbenen Fermentlösung. Alle

Abweichungen sollten also den verschiedenen Arten von *Aspergillus oryzae* zugeschrieben werden.

Jedenfalls war das Resultat, dass eine Art Pilzphosphoesterase alle Phosphorsäureester bei Ph 3.1 optimal angreift, nicht mehr verwunderlich, sondern sogar wertvoll, weil wir nun wissen, dass die Kleienphosphoesterase alle Ester bei Ph 5.5 optimal zerlegt.

Wir bezeichnen diese Art Takaphosphoesterase als T_1 und die welche sich entsprechend der Angabe von Kobayashi und Asakawa verhält, als T_2 . Die Differenzierung von *Aspergillus oryzae* nach der Phosphoesterase als Merkmal ist wünschenswert.

Chloräthylphosphorsäure wurde von Takaferment (T_2) bei Ph 5.6 kräftiger als bei 3.1 aufgespalten. Der Ester gehört also zu der zweiten Gruppe.

Substitution eines Wasserstoffatoms von primärem Alkohol mit einem Halogen veränderte also das fermentative Verhalten des betreffenden Phosphorsäureesters nicht, während Substitution mit der Phenylgruppe den Phosphorsäureester zu der ersten Gruppe übergeführt hat.

α , β -Dichlorhydrin gehört eigentlich zu den primären Alkoholen.

Aber sein Ester, α , β -Dichlorpropylphosphorsäure, wurde von Takaferment (T_2) bei Ph 3.1 viel besser als bei Ph 5.6 gespalten.

Substitution mit Halogenatom an beiden C-Atomen lässt die Propylphosphorsäure als zur ersten Gruppe zugehörig erscheinen.

α , α' -Dichlorisopropyl-, Brenzkatechin-, Resorcin- und Hydrochinonmonophosphorsäure wurden von demselben Ferment, wie erwartet, bei Ph 3.1 optimal hydrolysiert.

Resorcindiphosphorsäure wurde auch in derselben Weise gespalten. Wenn zweiwertiger Alkohol mit 2 Molekülen Phosphorsäure verestert wird, kann jede Phosphorsäure fermentativ so abgetrennt werden, als ob sie für sich in Form von Monoester vorhanden wäre. Dieses Verhalten wurde früher von Kobayashi (1929) bei Diphosphoglycerinsäure beobachtet. Dieselbe Regel gilt weiter beim Polyphosphorsäureester des mehrwertigen

Alkohols, wie Horiuchi kürzlich bei Phytin beweisen konnte.

Meta- und Paracarboxyphenylphosphorsäure wurden auch durch Takaferment (T_2) bei Ph 3.1 besser als bei Ph 5.6 angegriffen.

Kernsubstitution mit COOH-Gruppe verursacht also keine Veränderung an dem fermentativen Verhalten der Phenylphosphorsäure, abgesehen davon, dass die Substitution bei Orthostellung die oben erwähnte Unbeständigkeit der Estersäure verursacht und folglich den Ester als Substrat für Fermentstudien ungeeignet macht.

Nierenphosphoesterase griff alle untersuchten Substrate in alkalischem Medium an. Die optimale Acidität war Ph 9–10.

Ihre Wirkung in saurer Reaktion wurde noch nicht untersucht.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER PHOSPHORSÄUREESTER.

A. *Chloräthylphosphorsäure.*

Man mischt 10 g 100%iger Phosphorsäure (1/10 Mol) und 14 g Phosphorpentoxyd (1/10 Mol) im Becherglase. Beim Umrühren geht der grösste Teil des Phosphorpentoxyds unter Wärmeentwicklung in Lösung. 72 g Äthylenchlorhydrin (3/10 Mol) werden dann in Portionen unter gutem Umrühren hinzugesetzt, und die Reaktionsmasse wird im Exsikkator über Nacht stehen gelassen. Man löst sie in 1 Liter Wasser, versetzt mit fein gepulvertem Bariumhydroxyd bis zu schwach alkalischer Reaktion und entfernt den überschüssigen Baryt durch Kohlensäure. Das Filtrat wird unter vermindertem Druck bis zu 2/3 seines Volumens eingengt und von dem ausgeschiedenen Bariumcarbonat durch Filtration befreit. Wenn man dann dem klaren Filtrat langsam das gleiche Volumen Alkohol zufügt, scheidet das Bariumchloräthylphosphat in farblosen lanzettförmigen Kristallen aus. Ausbeute 35.5 g.

0.32145 g des lufttrockenen Salzes wogen 0.30334 g nach Trocknen bei 140° über P_2O_5 unter vermindertem Druck.

Gewichtverlust 0.01811 g. Das Bariumsalz enthält also 1 Molekül Kristallwasser.

0.20342 g kristallwasserfreies Salz wurde in 100 cem Wasser in einem Messkolben gelöst. In aliquoten Teilen wurden Barium gravimetrisch und Phosphor colorimetrisch nach Briggs bestimmt.

Für $C_2H_4O_4Cl P Ba + H_2O$ (313.888) berechnet:	Kristallwasser	1 Mol
	gefunden:	1 Mol
Für $C_2H_4O_4Cl P Ba$ (295.872) berechnet:	P 10.5%, Ba 46.4%	
	gefunden:	P 10.2%, Ba 46.2%

B. α, β -Dichlorpropylphosphorsäure.

Zuerst wird α, β -Dichlorhydrin durch Chlorierung des Allylalkohols nach Hübner und Müller (1871) bereitet. Siedepunkt 182° . Der chlorierte Alkohol wird in derselben Weise wie bei Chloräthylphosphat phosphoriert und das Bariumsalz mit Alkohol gefällt. Es kristallisiert in feinen Nadeln und enthält 2 Moleküle Kristallwasser.

Analyse:

Für $C_3H_5Cl_2PO_4 Ba + 2H_2O$ (380.362) berechnet:	Kristallwasser	2 Mol
	gefunden:	1.9 Mol
Für $C_3H_5Cl_2PO_4 Ba$ (344.33) berechnet:	P 9.0%, Ba 39.9%	
	gefunden:	P 8.8%, Ba 39.8%

C. α, α' -Dichlorisopropylphosphorsäure.

α -Dichlorhydrin wird in derselben Weise wie oben phosphoriert.

Das Bariumsalz kristallisiert in feinen Nadeln und enthält 2 Moleküle Kristallwasser. Ausbeute 7 g aus 38 g Dichlorhydrin.

Analyse:

Für $C_3H_5Cl_2PO_4 Ba + 2H_2O$ (380.362) berechnet:	Kristallwasser	2 Mol
	gefunden:	1.9 Mol

Für $C_3H_5Cl_2PO_4$ Ba (344.33) berechnet: P 9.0%, Ba 39.9%
gefunden: P 8.8%, Ba 39.8%

C. α, α' -Dichlorisopropylphosphorsäure.

α -Dichlorhydrin wird in derselben Weise wie oben phosphoriert.

Das Bariumsalz kristallisiert in feinen Nadeln und enthält 2 Moleküle Kristallwasser. Ausbeute 7 g aus 38 g Dichlorhydrin.

Analyse:

Für $C_3H_5Cl_2PO_4$ Ba + $2H_2O$ (380.362) berechnet:

Kristallwasser 2 Mol

gefunden: 1.9 Mol

Für $C_3H_5Cl_2PO_4$ Ba (344.33) berechnet: P 9.0%, Ba 39.9%
gefunden: P 8.9%, Ba 40.5%

D. Brenzkatechinmonophosphorsäure.

Phosphorierung wie bei den oben erwähnten Estern. Nur wird das Gemisch des Brenzkatechins und der Phosphorpentoxyd-Phosphorsäure im Paraffinbad auf 120° so lange erhitzt, bis die ganze Masse sich gut verflüssigt. Das Bariumsalz kristallisiert in Blättchen.

Ausbeute 17 g aus 33 g Brenzkatechin. Kristallwasserfrei.

Analyse:

Für $C_6H_5O_5P$ Ba (325.42) berechnet: P 9.5%, Ba 42.2%
gefunden: P 9.3%, Ba 41.8%

E. Resorcinmonophosphorsäure.

Phosphorierung wie oben erwähnt. Das Gemisch wird in diesem Fall auf 128° erhitzt. Das Bariumsalz kristallisiert lanzettförmig. Kristallwasserfrei. Ausbeute 11 g aus 33 g Resorcin.

Analyse:

Für $C_6H_5O_5P$ Ba (325.42) berechnet: P 9.5%, Ba 42.2%
gefunden: P 9.5%, Ba 42.4%

F. Hydrochinonmonophosphorsäure.

Phosphorierung wie oben erwähnt. Die Temperatur des Paraffinbads ist bei Hydrochinon 150°. Das Bariumsalz kristallisiert in Blättchen und enthält 3 Moleküle Kristallwasser. Ausbeute 15 g aus 33 g Hydrochinon.

Analyse:

Für $C_6H_5O_5P$ Ba + $3H_2O$ (379.468) berechnet:

Kristallwasser 3 Mol
gefunden: 3 Mol

Für $C_6H_5O_5P$ Ba (325.42) berechnet: P 9.5%, Ba 42.2%
gefunden: P 9.5%, Ba 42.3%

G. Resorcindiphosphorsäure.

Man stellt zuerst Resorcindioxychlorphosphin nach Angabe von Kanauer (1894) dar. 30 g Resorcin werden in mit Rückflusskühler versehenem Rundkolben mit 120 g Phosphoroxychlorid auf dem Sandbade etwa 12 Stunden erhitzt, bis die Salzsäureentwicklung aufhört. Überschüssiges Phosphoroxychlorid wird dann abdestilliert, und die hinterbliebene gelblich gefärbte dicke Flüssigkeit im luftverdünnten Raum fraktioniert.

Resorcindioxychlorphosphin geht bei 220° unter 65 mm Druck über. Es wird noch durch Rektifikation gereinigt. Das Estersäurechlorid wird dann im Erlenmeyerkolben mit Benzol überschichtet und unter guter Abkühlung mit einer berechneten Menge Wasser versetzt.

Bald beginnt lebhafte Salzsäureentwicklung unter Selbsterwärmung des Kolbeninhalts. Man stellt den Kolben, mit Calciumrohr verbunden, an einen kühlen Ort. Am fünften Tage hört die Salzsäureentwicklung auf, und am siebenten Tage bemerkt man im Benzol eine reichliche Kristallmasse. Sie wird nach 2 Tagen scharf abgesaugt und im Exsikkator über Schwefelsäure aufbewahrt. Sie ist, wenn ganz getrocknet, frei von Halogen und anorganischem Phosphor, aber hygroskopisch. Schmelzpunkt 132°. Die scharf getrocknete Substanz gab die folgende Analyse:

Für $C_6H_8O_8P_2$ (270.104) berechnet: P 23.0%
gefunden: P 22.5%

H. *Phosphosalicylsäure.*

Sie wird nach Anschütz und Emery (1885) hergestellt. Die aus Benzol kristallisierte Kristallmasse wird zweimal mit Äther gewaschen und im Exsikkator über Schwefelsäure und Kalilauge aufbewahrt. Schmelzpunkt 150° .

Analyse:

Für $C_7H_7O_6P$ (218.076) berechnet: P 14.2%
gefunden: P 14.0%

I. *m-Carboxyphenylphosphorsäure.*

Nach Anschütz und Moore (1887) hergestellt. Schön ausgebildete feine Nadeln. Die aus Wasser umkristallisierte Substanz schmilzt bei 203° . Kristallwasserfrei.

Analyse:

Für $C_7H_7O_6P$ (218.076) berechnet: P 14.2%
gefunden: P 14.4%

J. *p-Carboxyphenylphosphorsäure.*

Nach Anschütz und Moore hergestellt. Feine Nadeln. Sie enthält kein Kristallwasser und kann aus Wasser umkristallisiert werden. Schmelzpunkt 201° .

Analyse:

Für $C_7H_7O_6P$ (218.076) berechnet: P 14.2%
gefunden: P 14.3%

II. DARSTELLUNG DER FERMENTLÖSUNG.

Takaferment wurde nach Kobayashi-Inouye (1927, 1928) durch Adsorptionsverfahren gereinigt (siehe die Mitteilung von Kurata: diese Zeitschrift, **14**, 25). Die bebrauchten Fermentlösungen waren aus 2 Arten Takadiastase hergestellt, die in den

Protokollen als T_1 und T_2 bezeichnet wurden. Nierenphospho-
esterase wurde nach Asakawa (1928) hergestellt.

III. VERSUCHSANORDNUNG.

Bei den fermentativen Versuchen bestand die Lösung im
allgemeinen aus:

M/200 Substratlösung	5.0 cem
Puffer	5.0 cem
Wasser	10.0 cem
Fermentlösung	5.0 cem

Die endliche Konzentration des Substrats war also in jedem
Falle M/1000. Bariumsalz wurde vorher in Kalisalz übergeführt,
indem seine abgewogene Menge in Wasser gelöst, mit der berech-
neten Kaliumsulfatlösung versetzt, auf bestimmtes Volumen mit
Wasser verdünnt und vom Bariumsulfat abfiltriert wurde.

Pufferlösung war M/2 Acetat-Essigsäure, M/10 Glykokoll-
Salzsäure oder M/10 Glykokoll-Natron.

Abgespaltene anorganische Phosphorsäure wurde nach Briggs
colorimetrisch bestimmt. Die Zahlen in den nachstehenden Proto-
kollen beziehen sich auf gefundene Orthophosphorsäure als P in mg,
berechnet für 1 cem Versuchslösung. Die Versuchstemperatur war
 37° und wurde elektrisch reguliert. Ph elektrometrisch.

IV. ÜBER DIE UNBESTÄNDIGKEIT DER PHOSPHOSALICYLSÄURE.

Der Einfluss der Wasserstoffzahl auf die Labilität wurde zuerst
untersucht. Man bereitete M/1000 Phosphosalicylatlösung mit
variierenden Ph wie folgt und stellte sie sofort in ein Wasserbad
von 37° .

M/100 Phosphosalicylsäure	2.0 cem
M/10 Natronlauge	0.6 cem
Puffer	10.0 cem
Wasser	7.4 cem

Nach 3 Stunden wurden 5 ccm der Lösung mit dem gleichen Volumen 8%iger Trichloressigsäure versetzt, und die anorganische Phosphorsäure wurde nach Briggs bestimmt. Die für das Experiment zu brauchende Phosphosalicylsäurelösung sollte jeden Tag frisch hergestellt werden.

In der folgenden Tabelle I wird die nachgewiesene Orthophosphorsäure in hydrolytische Prozente umgerechnet angegeben.

TABELLE I.

Ph	2.0	3.0	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	8.0	9.0
anorganischer Phosphor in % nach 3 Std.	15.2	25.8	41.9	55.5	56.5	53.5	49.4	25.2	15.8	10.0

Zur Ermittlung der Titrationskurve der Phosphosalicylsäure wurden für jede elektrische Ph-Bestimmung 5 ccm frisch hergestellter M/10 Lösung mit einer bestimmten Menge M/10 Natronlauge versetzt, mit destilliertem Wasser auf 20 ccm verdünnt und sofort zum Ph-Bestimmungsapparat gebracht. Die zugesetzte Alkalimenge und die gemessenen Ph werden in Tabelle II angegeben.

Durch diese umständliche Arbeitsweise dürften wir doch ein

TABELLE II.

M/10 Phosphosalicylsäure	N/10 NaOH	H ₂ O	Ph
5 ccm	0 ccm	15 ccm	1.23
"	1.0	14.0	1.33
"	2.5	12.5	1.55
"	4.0	11.0	1.97
"	5.0	10.0	2.30
"	6.0	9.0	3.14
"	7.5	7.5	3.96
"	9.0	6.0	4.69
"	10.0	5.0	5.58
"	11.0	4.0	6.03
"	12.5	2.5	6.61
"	14.0	1.0	7.17
"	15.0	0	8.06

genaueres Resultat als durch direkte elektrometrische Titration bekommen haben.

Als Kontrolle wurde die Titrationskurve des Gemisches aus Salicylsäure und Phosphorsäure ermittelt. Da die Salicylsäure für sich nicht leicht in Wasser löslich ist, wurde M/100 Lösung des Gemisches vorbereitet. 0.1380 g, 1/1000 Grammmolekül, Salicylsäure wurde mit 5 ccm M/5 Phosphorsäure versetzt und mit destilliertem Wasser auf 100 ccm verdünnt. 5 ccm der Lösung wurden wie bei der Phosphosalicylsäure mit einer variierenden Menge M/100 Natriumlauge versetzt, mit Wasser auf 20 ccm verdünnt und zum Ph-Bestimmungsapparat gebracht. Die ermittelten Ph-Werte waren wie folgt:

TABELLE III.

M/100 (Salicylsäure + Phosphorsäure)	N/100 NaOH	H ₂ O	Ph
5 ccm	0 ccm	15 ccm	1.94
"	1.0	14.0	2.06
"	2.5	12.5	2.18
"	4.0	11.0	2.30
"	5.0	10.0	2.53
"	6.0	9.0	2.62
"	7.5	7.5	3.00
"	9.0	6.0	3.86
"	10.0	5.0	5.47
"	11.0	4.0	6.55
"	12.5	2.5	7.10
"	14.0	1.0	7.61
"	15.0	0	8.26

V. ERGEBNISSE DER FERMENTVERSUCHE.

(1) Nierenphosphoesterase.

A. Chloräthylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	2 $\frac{1}{2}$ St.
8.0	0.0066	0.0122	0.0255
9.0	0.0186	0.0235	0.0275
10.1	0.0148	0.0196	0.0223

B. α, β -Dichlorpropylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
8.0	0.0074	0.0142	0.0274
9.0	0.0216	0.0274	0.0290
10.1	0.0214	0.0251	0.0281

C. α, α' -Dichlorisopropylphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
8.0	0.0072	0.0118	0.0252
9.0	0.0236	0.0270	0.0280
10.1	0.0228	0.0249	0.0252

D. Brenzkatechinmonophosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.
7.6	0.0046	0.0074
8.6	0.0156	0.0266
9.8	0.0298	0.0301
9.9	0.0307	0.0310
10.4	0.0275	0.0301

E. Resorcinmonophosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.
7.8	0.0070	0.0102
8.7	0.0212	0.0279
9.7	0.0297	0.0301
9.9	0.0305	0.0309
10.3	0.0302	0.0305

F. Hydrochinonmonophosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.
7.9	0.0072	0.0116
8.7	0.0212	0.0276
9.8	0.0297	0.0309
9.9	0.0305	0.0310
10.4	0.0302	0.0305

G. Resorcindiphosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.
8.6	0.0153	0.0258
9.0	0.0230	0.0392
9.5	0.0298	0.0451
10.3	0.0052	0.0092

I. m-Carboxyphenylphosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	1 St.	3 St.
7.2	0.0056	0.0152
8.2	0.0128	0.0302
9.0	0.0274	0.0307
10.1	0.0302	0.0307
11.0	0.0061	0.0119

J. p-Carboxyphenylphosphorsäure
(M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	1 St.	3 St.
7.2	0.0061	0.0179
8.2	0.0122	0.0286
9.0	0.0204	0.0307
10.1	0.0224	0.0309
11.0	0.0032	0.0080

(2) Takaphosphoesterase (T₁)A. Chloräthylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
2.4	0.0106	0.0145	0.0202
3.1	0.0120	0.0161	0.0209
4.0	0.0085	0.0122	0.0190
4.8	0.0046	0.0071	0.0137
5.9	0.0044	0.0058	0.0103

B. α, β -Dichlorpropylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
2.4	0.0223	0.0228	0.0233
3.1	0.0228	0.0232	0.0245
4.0	0.0223	0.0228	0.0239
4.8	0.0180	0.0224	0.0236
5.9	0.0086	0.0133	0.0213

C. α, α' -Dichlorisopropylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
2.4	0.0071	0.0093	0.0113
3.1	0.0142	0.0192	0.0219
4.0	0.0117	0.0173	0.0211
4.8	0.0085	0.0123	0.0187
5.9	0.0046	0.0067	0.0156

D. Brenzkatechinmonophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0246	0.0250	0.0258
3.9	0.0245	0.0246	0.0254
5.0	0.0200	0.0238	0.0252
5.8	0.0062	0.0088	0.0168

E. Resoreinmonophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0209	0.0214	0.0223
3.9	0.0182	0.0212	0.0219
5.0	0.0123	0.0179	0.0213
5.8	0.0051	0.0084	0.0140

F. Hydrochinonmonophosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0242	0.0251	0.0254
3.9	0.0210	0.0243	0.0246
5.0	0.0140	0.0202	0.0246
5.8	0.0057	0.0090	0.0161

G. Resoreindiphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0471	0.0510	0.0523
3.9	0.0408	0.0505	0.0515
4.9	0.0096	0.0182	0.0363
5.9	—	0.0060	0.0142

I. m-Carboxyphenylphosphorsäure (M/1000) + Takaferment (T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0302	0.0307	0.0307
5.6	0.0068	0.0110	0.0215
6.5	—	—	0.0037

J. p-Carboxyphenylphosphorsäure(M/1000) + Takaferment(T₁).

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	2 $\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0282	0.0309	0.0309
5.6	0.0032	0.0041	0.0100
6.5	—	—	0.0067

(3) Takaphosphoesterase(T₂)A. Chloräthylphosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0084
5.6	0.0097
6.5	0.0071

B. α, β -Dichlorpropylphosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0232
5.6	0.0190
6.5	0.0091

C. α, α' -Dichlorisopropylphosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0162
5.6	0.0130
6.5	0.0071

D. Brenzkatechinmonophosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0236
5.6	0.0152
6.5	0.0056

E. Resorcinmonophosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0189
5.6	0.0122
6.5	0.0069

F. Hydrochinonmonophosphorsäure
(M/1000) + Takaferment(T₂).

Ph \ Zeit	21 St.
3.1	0.0223
5.6	0.0135
6.5	0.0074

LITERATUR.

- Anschütz, R. und Emery, W. O. (1885): Ann. d. Chem., **228**, 308.
Anschütz, R. und Moore, G. D. (1887): Ann. d. Chem., **239**, 333.
Asakawa, K. (1928): J. of Biochem., **10**, 157.
Asakawa, K. (1929): J. of Biochem., **11**, 143.
Bergmann, M., Miekeley, A., Weimann, F. und Kann, E. (1925):
Z. Physiol. Chem., **143**, 108.
Fischer, E. und Pfähler, E. (1920): Ber. Dtsch. chem. Ges., **53**, 1606.
Henry, R. Plimmer, A. und Burch, W. G. N. (1929): Jour. of chem.
Soc. London, Febr.
Horiuchi, K. (1931): J. of Biochem. **14**, 163.
Hübner, H. und Müller, K. (1871): Ann. d. Chem., **159**, 168.
Inouye, K. (1928): J. of Biochem., **10**, 133.
Kanauer, W. (1894): Ber. Dtsch. chem. Ges., **27**, 2568.
Kobayashi, H. (1927): J. of Biochem., **8**, 205.
Kobayashi, H. (1929): J. of Biochem., **11**, 173.
Kurata, K. (1931): J. of Biochem., **14**, 25.
Landolt-Börnstein: Physikalisch-chemische Tabellen 5. Auflage, Berlin 1923.
Langheld, K. (1911): Ber. Dtsch. chem Ges., **44**, 2076.

ÜBER DAS WESEN DER PILOCARPINHYPER- GLYKÄMIE.

VON

TAKAO INOUE.

(Aus der medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 12. März, 1931)

In meinen früheren Arbeiten konnte ich feststellen, dass die Pilocarpinhyperglykämie ihre Zuckerquelle hauptsächlich in dem Leberglykogen hat (Inoue 1929) und durch die Splanchnicotomie vollständig beseitigt wird, auch durch die Exstirpation beider Nebennieren, wenn auch nicht vollständig, doch stark verhindert werden kann (Inoue 1930). Zur Aufklärung des Wesens dieser Hyperglykämie muss weiter das Verhalten der Nervi vagi berücksichtigt werden. Diesbezügliche Untersuchungen sind gerade deswegen sehr wichtig, weil das Pilocarpin nach der hergebrachten Ansicht die peripheren Endigungen der Vagi reizt, und weil sich aus meinen Untersuchungen ergibt, dass die Pilocarpinhyperglykämie nicht nur durch Ergotoxin, sondern auch durch Atropin vollständig verhindert wird (Inoue, 1928). Auch fehlt es nicht an Untersuchungen über die Bedeutung der Vagi für den Kohlehydratstoffwechsel überhaupt und auch für die Pilocarpinhyperglykämie.

Nach Kendzierski (1924) ruft bei Hunden die Durchschneidung beider Vagi an der Cardia eine leichte Senkung des Blutzuckerspiegels hervor. Dieser Befund entspricht der Beobachtung von Amato (1927), wonach während des Vagusblocks durch die Stovainbepinselung ein erheblicher Blutzuckerabfall eintrat. Auch die Hyperglykämie, die bei normalen Hunden durch intravenöse Injektion parasymphicomimetischer Substanzen hervorgerufen wurde, verminderte sich nach der Vagotomie auf die Hälfte

(Kendzierski). Papilian und Funariu (1926) sahen, dass auch bei Hunden nach der Durchschneidung beider Vagi an der Cardia die Pilocarpin- und Adrenalinhyperglykämie gehemmt wird. Bezüglich der letzteren gelangte Nakayama (1924 bei Kaninchen zu einem anderen Resultat. Nach ihm kann die Vagotomie die Schwelle für Adrenalinglykosurie stark herabsetzen, die Hyperglykämie dagegen nicht beeinflussen. Nach Dresel und Omonsky (1927) wird die Adrenalinhyperglykämie bei denselben Tieren durch Vagotomie verstärkt, was mit den Beobachtungen von Hisamoto (1928) übereinstimmt. Dagegen wird die Pilocarpinhyperglykämie nach Masamune (1926) bei Kaninchen durch die Vagotomie nicht beeinflusst.

Auch die Einflüsse der elektrischen Reizung der Vagusstümpfe auf den Blutzuckerspiegel müssen in Betracht gezogen werden. Was die Reizung der peripheren Stümpfe betrifft, so beobachtete schon Claude Bernard (1920), dass die Reizung des peripheren Vagusstumpfes keine Glykosurie hervorrief. De Corral (1918) beobachtete nach der Zerstörung der Nerven, die zur Leber gelangen, eine Senkung des Blutzuckerspiegels durch die elektrische Reizung desselben Stumpfes. McCormack und O'Brien (1923) konnten dieselbe Wirkung bei dezerebrierten Katzen und bei mit Äther narkotisierten Hunden und Kaninchen feststellen. Auch Britton (1925) beobachtete bei Katzen denselben Effekt, wenn vorher die linke Nebenniere oder der linke Splanchnicus ausser Funktion gesetzt wurde. Hoshi (1926) konstatierte bei Hunden eine Erniedrigung des Blutzuckerspiegels, bei Kaninchen dagegen eine Erhöhung desselben durch die Reizung des peripheren Vagusstumpfes. Nach Hoshi ist das chromaffine System bei den letzteren sehr empfindlich, sodass die gesteigerte innersekretorische Funktion des Pankreas durch die Nebennierenfunktion verdeckt wird. In gewissem Gegensatz zu diesen Ergebnissen, aus denen auf die blutzuckersenkende Wirkung der elektrischen Reizung am peripheren Vagusstumpfe geschlossen werden kann, steht der Effekt derselben Reizung am zentralen Stumpfe. Schon Cl. Ber-

nard(1920) beobachtete, dass durch Reizung des zentralen Vagusstumpfes Glykosurie hervorgerufen wurde. Houssay und Molinelli (1924, 1925) konnten eine reflektorische Adrenalinsekretion durch Reizung des zentralen Vagusstumpfes konstatieren.

Die letztere Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die periphere Erregung des Vagus durch Pilocarpin auch zentripetal geleitet wird und eine reflektorische Hyperglykämie hervorruft, indem der Reiz nun durch den Sympathicus peripheriwärts übertragen wird. Diese Auffassung vertritt Maibo (1921). Ihm kommt auch Kunika (1927) sehr nahe mit seiner Annahme, dass Pilocarpin primär den Parasympathicus reizt, und dass diese Erregung auf irgendeine Weise—der Mechanismus wird dabei nicht erwähnt—schliesslich in den Sympathicus geleitet wird. Dagegen lehnt Masamune (1926) die zentripetale Leitung des peripheren Vagusreizes ab und nimmt direkte zentrale Reizung an. Nach Sakurai (1926) ist die durch die Parasympathicusgifte hervorgerufene Hyperglykämie ebenfalls von zentraler Natur, indem sie aber “nicht infolge einer eigentlichen, Parasympathicus reizenden Wirkung der Gifte, sondern infolge deren Nebenwirkung” hervorgerufen wird. Auch Kusunoki (1926) scheint die eigentliche Pilocarpinwirkung in der gesteigerten Insulinsekretion zu erblicken, während die Erregung des sympathischen Zuckerzentrums als Nebenwirkung angesehen wird. Saito (1921) schreibt im Anschluss an die Meinung von Allen die Ursache der Hyperglykämie der Asphyxie des Zentralnervensystems zu. Kinoshita (1926) nimmt eine zentrale Reizung, die “direkt oder indirekt” hervorgerufen wird, an. Auffallender Weise fehlen allen diesen Arbeiten experimentelle Untersuchungen über den Sitz der zentralen Reizung, sodass die genannten Autoren sich bloss darauf beschränken, einfach von “Zentrum oder zentraler Wirkung” zu sprechen.

Aus diesen Gründen bemühte ich mich, in der vorliegenden Arbeit drei Fragen klarzustellen. Das erste Problem betrifft die Bestimmung der Lokalisation des Zentrums, dessen Erregung die

Pilocarpinhyperglykämie zur Folge haben kann. Das zweite bezieht sich darauf, welche Rolle die Vagi bei der Entstehung der Pilocarpinhyperglykämie spielen könnten. Drittens kommt in engem Zusammenhang mit beiden Problemen die Frage in Betracht, auf welche Weise Atropin die Pilocarpinhyperglykämie beseitigen kann.

VERSUCHSANORDNUNG.

Zu meinen Untersuchungen wurden nur männliche Kaninchen, die sich in einem guten Ernährungszustand befanden, gebraucht. Sie wurden vor dem Versuch immer 24 Stunden lang im Hungerzustand gehalten.

Unsere Untersuchungen behandelten im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zunächst die Einflüsse der Vagotomie auf den Blutzuckerspiegel und auf die Pilocarpinhyperglykämie, ferner die Beeinflussbarkeit des Blutzuckerspiegels durch die elektrische Reizung der zentralen bzw. peripheren Vagusstümpfe. Bei den letzteren Versuchen wurden zwecks Kontrolle dieselben Untersuchungen auch an den Ischiadicusstümpfen wiederholt.

Bei der Vagotomie wurde die Schultzesche Methode (1900) angewandt. Auch die elektrische Reizung des peripheren Vagusstumpfes wurde an dem Vagus, der nach Schultze unterhalb des Zwerchfells durchschnitten wurde, ausgeführt. Dabei wurde der durchschnittene, periphere Nervenstumpf mit einem Faden abgebunden. Während der Nervenstumpf selbst wieder in die Bauchhöhle zurückgebracht, und der Hautschnitt teilweise geschlossen wurde, blieb das Ende des Fadens ausserhalb der Bauchhöhle, sodass der Nervenstumpf bei der Reizung immer leicht nach aussen herausgezogen werden konnte.

Die elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes wurde dagegen nicht unterhalb des Zwerchfells, sondern am Hals ausgeführt. Nachdem die Haut an der einem zu untersuchenden Vagus entsprechenden Seite enthaart und mit Jodtinktur desinfiziert worden war, wurde ein etwa 5 cm langer Hautschnitt in geringer

Entfernung von der vorderen Medianlinie vorgenommen. Der Vagus, der dorsal und lateral von der Carotis communis verläuft, wurde von der Umgebung abpräpariert und dann in der Nähe der Clavicula durchschnitten. Das zentrale Vagusende wurde ebenfalls mit einem Faden abgebunden, dessen Ende auch nach der teilweisen Schliessung des Hautschnittes ausserhalb blieb.

Zur Reizung wurde ein faradischer Apparat gebraucht, dessen Rollenabstand zwischen 5 und 30 cm variierte. Die Reizungsdauer betrug bei den einzelnen Versuchen 2 bis 10 Minuten, wobei die Reizung 6 mal pro Minute kurz unterbrochen wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit handelte es sich um die Bestimmung der Lokalisation des Zentrums, das durch Pilocarpin gereizt werden kann. Ich stellte zuerst Untersuchungen über die Einflüsse der Grosshirnexstirpation auf die Pilocarpinhyperglykämie an. Dabei wurden beide Grosshirnhemisphären genau nach der Beschreibung von Morita (1915) abgetragen, sodass es sich erübrigt, die Operationstechnik hier anzugeben. Bei den weiteren Versuchen wurde das Verhalten der Pilocarpinhyperglykämie bei solchen Tieren beobachtet, deren Grosshirn mit Zwischen- und Mittelhirn von den kaudalen Hirnteilen getrennt worden war. Die dabei angewandte Technik war folgende: Den in der Bauchlage fixierten Tieren wurden die Kopfhaare abgeschoren. Nach der Desinfektion der Kopfhaut mit Jodtinktur wurde ein Hautschnitt in der Medianlinie vom Mittelpunkt einer beide Augen verbindenden Linie bis zum Mittelpunkt einer beide Meati auditorii externi verbindenden Linie vorgenommen. Dann wurden die Weichteile vom Schädel mit einem stumpfen Instrument abpräpariert. Nun wurde die Spitze eines Trepanatoriums mit einem Durchmesser von 1,5 cm in den Kreuzpunkt der Pfeilnaht mit der Kranznaht gestellt. Nach der Trepanation wurde das Loch nach hinten stumpf erweitert, bis die Lambdanaht etwas überschritten wurde. Nun wurde die Dura mater an den beiden Seiten, etwa 0,5 cm von der Medianlinie entfernt, längs und am vorderen Rand des Knochenlochs quer durchschnitten. Wenn man jetzt diesen 1 cm

breiten Durastreifen nach hinten umklappte, so wurde im hinteren Teil des Gesichtsfeldes die Grenze zwischen Gross- und Kleinhirn sichtbar. Wenn man mit einem dünnen Spatel, der 3,5 cm lang und 0,7 cm breit war, an dieser Grenze, und zwar möglichst nach dem Zerebellum, senkrecht auf die Schädelbasis in die Tiefe eindrang, so wurde das Grosshirn mit Zwischenhirn und Corpora quadrigemina und meistens auch mit einem Teil der Brücke von dem kaudalen Hirnabschnitt abgetrennt, sodass die Schnittfläche ungefähr derjenigen der Sherringtonschen Operation (1915) entsprach. Jedenfalls blieb die Medulla oblongata unverletzt.

Im dritten Teil wurden Untersuchungen darüber angestellt, ob die Adrenalinhyperglykämie durch Atropin unterdrückt werden könne.

Bei meinen Versuchen wurden alle Operationen ohne Narkose ausgeführt. Die Resultate der Operationen wurden nach dem Versuch immer durch Autopsie streng kontrolliert.

Insofern es sich um die Untersuchungen über die Pilocarpinwirkung handelte, wurden die meisten Versuche *ceteris paribus* auch mit Adrenalin wiederholt, was besonders bei den Pilocarpinversuchen mit negativen Resultaten sehr wichtig erschien. Denn wenn unter denselben Versuchsbedingungen die Pilocarpininjektion immer negative, dagegen die Adrenalininjektion positive Ergebnisse ergibt, so dürfen die negativen Resultate nicht als zufällige Versuchsfehler angesehen werden.

Pilocarpin und Atropin wurden stets in einer Dosis von 3,0 mg pro Kilo Körpergewicht, Adrenalin in einer Dosis von 0,30 mg pro Kilo Körpergewicht subkutan verabreicht.

Der Blutzucker wurde nach der alten Methode von Bang bestimmt.

Versuchsergebnisse.

I. VERSUCHE AN DEN VAGOTOMIERTEN KANINCHEN.

A. Einflüsse der vegetativen Nervengifte auf den Blutzuckerspiegel bei den vagotomierten Kaninchen.

In dieser Versuchsreihe wurden den Kaninchen, bei denen im voraus die Pilocarpin-bzw. Adrenalinhyperglykämie untersucht wurde, beide Vagi nach Schultze durchgeschnitten. Bei denselben Tieren wurden 4 bis 8 und 30 bis 50 Tage nach der Operation die Einflüsse der betreffenden Gifte auf den Blutzuckerspiegel wiederholt untersucht.

1. Versuche mit Pilocarpin.

Nachdem bei 5 Kaninchen die Einflüsse des Pilocarpins (3,0 mg pro Kilo Körpergewicht) auf den Blutzuckerspiegel untersucht worden waren (Mittelwert der absoluten Zuckerzunahme 0,070 g%, Mittelwert der relativen 76,1%, Tabelle I), wurden die Tiere vagotomiert. Wie die Tabelle II zeigt, erhöhte sich der Blutzuckerspiegel 1 bis 2 Stunden nach der Operation ausnahmslos, manchmal sogar erheblich. Aber dieser operative Einfluss ging in den meisten Fällen schon nach 6 Stunden zurück. Der Wert nach 24 Stunden war in allen Fällen niedriger als vor der Operation. Aber nach 48 oder 72 Stunden erreichte der nüchterne Blutzucker in 3 von 5 Fällen wieder den Wert vor der Operation, sodass die von Kendzierski (1926) und Amato (1927) beobachtete Blutzuckersenkung nach der Vagotomie bzw. dem Vagusblock schwerlich als eine Erscheinung anzusehen ist, die für eine solche Manipulation eigentümlich ist.

4 bis 8 Tage nach der Operation wurde denselben Tieren wiederum Pilocarpin in derselben Dosis subkutan injiziert. Die Zunahme des Blutzuckers war im absoluten (Mittelwert 0,120 g%) und relativen Wert (Mittelwert 133,9%) viel deutlicher

TABELLE I. Pilocarpinversuche vor der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)								Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)
			nach d. Injektion (St.)									
			vor d. Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5		
1	10/VII 1929	2.450	0.085	0.157	0.182	0.185	0.169	0.102	0.085	0.081	0.100	117.6
2	10/VII "	2.100	0.082	0.173	0.173	0.137	0.119	0.088	0.079	0.073	0.091	109.8
3	19/VII "	2.290	0.095	0.136	0.133	0.127	0.105	0.090	0.091	0.095	0.041	43.1
4	19/VII "	2.110	0.108	0.151	0.186	0.160	0.155	0.163	0.122	0.100	0.078	72.2
5	5/IX "	2.620	0.106	0.143	0.146	0.145	0.140	0.121	0.091	0.086	0.080	37.7
Mittelwert											0.070	75.9

TABELLE II. Einflüsse der Vagotomie auf den Blutzuckerspiegel.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)											
			vor d. Operation	nach d. Operation (St.)										
				1	2	3	4	5	6	7	24			
1	13/VII 1929	2.350	0.090	0.235	0.247	0.220	0.199	0.156	0.086	0.081	0.066			
2	13/VII "	2.500	0.087	0.195	0.172	0.178	0.176	0.173	0.160	0.156	0.079			
3	25/VII "	2.300	0.106	0.209	0.200	0.154	0.130	0.126	0.102	0.109	0.089			
4	25/VII "	2.380	0.097	0.145	0.124	0.126	0.124	0.122	0.104	0.095	0.089			
5	9/IX "	2.600	0.096	0.133	0.093	0.091	0.083	0.080	0.077	0.079	0.080			

TABELLE III. Pilocarpinversuche nach der Vagotomie.

Nr. d. Kanäthen	Datum	Körper- gewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (%)	Maximale relative Zunahme (%)	Intervall zwi- schen Vago- tomie und Injektion
			vor d. Injek- tion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6				
1	17/VII 1929	2.240	0.091	0.105	0.181	0.179	0.221	0.229	0.210	0.139	0.060	0.138	151.6	5	
2	17/VII "	2.200	0.089	0.120	0.127	0.220	0.238	0.278	0.229	0.154	0.085	0.192	223.3	5	
3	1/VIII "	2.350	0.105	0.156	0.169	0.188	0.175	0.139	0.109	0.097	0.107	0.083	79.0	8	
4	31/VII "	1.870	0.127	0.128	0.130	0.150	0.141	2 1/2 St. n. d. Injektion +						6	
5	12/IX "	2.460	0.082	0.100	0.120	0.133	0.149	0.108	0.099	0.085	0.071	0.067	81.7	4	
Mittelwert													0.120	133.9	

TABELLE IV. Pilocarpinversuche nach der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körper- gewicht (kg)	vor d. Injek- tion	Blutzucker (g%)						Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale Zunahme (%)	Intervall zw- ischen Vago- tomie und Injektion		
				1/2	1	1 1/2	2	3	4				5	6
1	28/VIII 1929	2.150	0.100	0.181	0.254	0.247	0.221	0.174	0.112	0.111	0.108	0.154	154.0	47
2	24/VIII "	1.950	0.095	0.168	0.246	0.240	0.241	0.202	0.153	0.118	0.118	0.151	158.9	43
3	12/IX "	2.300	0.093	0.120	0.134	0.117	0.109	0.099	0.083	0.082	0.080	0.041	44.1	50
5	8/X "	2.650	0.079	0.114	0.101	0.088	0.077	0.074	0.070	0.075	0.080	0.035	44.3	30
Mittelwert													0.095	100.3

Tabelle III) als vor der Operation. Am vierten Kaninchen waren die Intoxikationserscheinungen wie Salivation, Erbrechen, Durchfälle usw. sehr heftig, sodass das Tier nach 2 Stunden einging. An den 4 übrig gebliebenen Tieren wurde 30 bis 50 Tage nach der Operation derselbe Versuch wiederholt. Die beiden ersten Tiere zeigten eine noch stärkere Zuckerzunahme als vor der Operation, während bei den beiden anderen Tieren die Zunahme fast denselben Grad wie vor der Operation zeigte (Tabelle IV). Also darf man daraus schliessen, dass die Pilocarpinhyperglykämie kurze Zeit nach der Vagotomie stärker hervortritt, diese Neigung aber später wieder zu verschwinden scheint.

2. *Versuche mit Adrenalin.*

Bei dieser Versuchsreihe wurden dieselben Tiere, die zu den oben erwähnten Versuchen gebraucht wurden, benutzt. Vor der Operation zeigten sie auf subkutane Injektion von Adrenalin (0,3 mg pro Kilo Körpergewicht) hin eine erhebliche Hyperglykämie (Mittelwert der maximalen absoluten Zunahme 0,231 g%, der der maximalen relativen 251,9%, Tabelle V). Wie man aus den Tabellen VI und VII ersehen kann, ergab die Adrenalininjektion, die 4 bis 8 und 33 bis 43 Tage nach der Operation wiederholt ausgeführt wurde, immer eine deutliche Hyperglykämie, deren Grad aber jetzt etwas geringer war. Diese Erscheinung kam bei den späteren Versuchen deutlicher zum Ausdruck.

3. *Versuche mit Pilocarpin und Atropin.*

In einer früheren Arbeit konnte ich feststellen, dass die Pilocarpinhyperglykämie durch Atropin vollständig aufgehoben werden kann. Nun dürfte es sehr interessant sein, zu untersuchen, wie die Pilocarpinhyperglykämie nach der Vagotomie durch Atropininjektion beeinflusst wird, zumal Atropin im allgemeinen als ein Gift angesehen wird, das die Peripherie des Vagus ausser Funktion setzt. Drei Kaninchen, die eine deutliche Pilocarpinhyperglykämie zeigten, wurden vagotomiert. 3 bis 4 Tage nach der Operation wurde allen Tieren zuerst Atropin in der Dosis von

TABELLE V. Adrenalinversuche vor der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme
			vor d. Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7		
1	5/VII 1929	2,290	0,087	0,157	0,153	0,358	0,388	0,346	0,327	0,325	0,307	0,182	0,301	346,0
2	5/VII "	2,250	0,079	0,178	0,278	0,328	0,319	0,290	0,270	0,212	0,182	0,082	0,249	315,2
3	15/VII "	2,380	0,093	0,206	0,274	0,305	0,319	0,307	0,236	0,180	0,175	0,102	0,226	243,1
4	15/VII "	2,400	0,116	0,179	0,240	0,266	0,285	0,296	0,235	0,203	0,192	0,119	0,180	155,2
5	3/VIII "	2,310	0,099	0,123	0,149	0,184	0,300	0,215	0,189	0,137	0,110	0,109	0,201	200,0
Mittelwert													0,231	251,9

TABELLE VI. Adrenalinversuche nach der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)							Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Intervall zwischen Vagotomie und Injektion
			vor d. Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7
1	20/VII 1929	2,050	0,094	0,187	0,218	0,248	0,297	0,359	0,344	0,286	0,208	0,097
2	20/VII "	2,140	0,109	0,144	0,159	0,179	0,257	0,270	0,285	0,264	0,196	0,125
3	29/VII "	2,300	0,107	0,211	0,288	0,323	0,308	0,301	0,263	0,154	0,103	0,095
4	29/VII "	2,210	0,101	0,137	0,210	0,244	0,264	0,286	0,283	0,241	0,145	0,100
5	16/IX "	2,350	0,033	0,119	0,168	0,209	0,218	0,214	0,195	0,138	0,103	0,088
Mittelwert										0,195	199,1	

TABELLE VII. Adrenalinversuche nach der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körperge- wicht (kg)	Blutzucker (g%)							Maximale absolute Zunahme (%)	Maximale relative Zunahme(%)	Intervall zwischen Va- gotomie und Injektion.		
			vord. Injek- tion	1/2	1	1 1/2	2	3	4				5	6
1	24/VIII 1929	2.150	0.100	0.161	0.201	0.278	0.265	0.243	0.235	0.229	0.185	0.122	0.178	43
2	24/VIII "	2.200	0.097	0.199	0.238	0.259	0.284	0.298	0.300	0.293	0.269	0.226	0.203	43
3	26/VIII "	2.390	0.108	0.206	0.300	0.301	0.305	0.305	0.269	0.208	0.124	0.115	0.197	33
5	11/X "	2.600	0.092	0.111	0.165	0.178	0.191	0.205	0.175	0.119	0.118	0.107	0.113	33
Mittelwert													0.170	170.9

TABELLE VIII. Versuche mit Pilocarpin und Atropin nach der Vagotomie.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)							Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Datum der Vagotomie	Bemerkung.
			vord. Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5			
6	10/III 1930	2,200	0.081	0.151	0.184	0.212	0.170	0.135	0.102	0.083	0.131	161.7	ohne Atropin mit Atropin
"	24/III "	2,160	0.089	0.087	0.083	0.077	0.075	0.082	0.078	0.074	0	0	20/III 1930
7	10/III "	2,300	0.091	0.134	0.171	0.193	0.164	0.137	0.121	0.094	0.102	112.1	ohne Atropin mit Atropin
"	28/III "	2,260	0.087	0.090	0.087	0.092	0.085	0.081	0.086	0.083	0	0	25/III "
8	15/III "	2,420	0.083	0.137	0.152	0.178	0.171	0.153	0.134	0.112	0.095	114.4	ohne Atropin mit Atropin
"	28/III "	2,240	0.097	0.108	0.098	0.095	0.088	0.086	0.083	0.087	0.011	11.3	25/III "
Mittelwert			ohne Atropin								0.109	129.4	
			mit Atropin								0.003	3.8	

3,0 mg pro Kilo Körpergewicht, nach 5 Minuten Pilocarpin in derselben Dosis subkutan injiziert. Nun zeigte die Blutzuckerkurve, die 5 Stunden lang nach der Injektion verfolgt wurde, keine Steigerung (Tabelle VIII). Da man nach der III. und IV. Tabelle weiss, dass die Pilocarpinhyperglykämie auch nach der Vagotomie unverändert oder sogar verstärkt auftreten kann, so muss man die jetzt gewonnenen, negativen Resultate der hemmenden Wirkung des Atropins zuschreiben. Somit gelangt man zu dem sehr wichtigen Ergebnis, dass für das Zustandekommen der hemmenden Atropinwirkung, insoweit die Pilocarpinhyperglykämie in Betracht kommt, die Intaktheit des Vagus gar nicht vorausgesetzt zu werden braucht. Der Angriffspunkt des Atropins bei der Pilocarpinhyperglykämie soll später erörtert werden.

B. Einflüsse der elektrischen Reizung der Vagusstümpfe auf den Blutzuckerspiegel.

Wenn die Pilocarpinhyperglykämie durch die zentripetale Leitung der peripheren Vaguserregung reflektorisch hervorgerufen würde, wie Maibo (l. c.) annimmt, so müsste man auch eine Hyperglykämie durch elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes erwarten. Hierfür sprechen schon die Beobachtungen von Bernard (1920), Houssary und Molinelli (1924, 1925). Wenn diese auch noch von anderen Forschern konstatiert werden sollten, so ist es doch eine andere Frage, ob die Pilocarpinhyperglykämie in ihrem Wesen mit ihnen ohne weiteres identifiziert werden kann.

1. Elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes.

Die Versuche wurden teils an gefesselten, teils an frei gelassenen Tieren ausgeführt. Wie die Tabelle IX zeigt, steigerte sich der Blutzucker bei den ersteren nach der Operation manchmal sehr deutlich. Da die elektrische Reizung immer 3 Stunden nach der Operation appliziert wurde, so wurde die Blutzuckerkurve auch bei den Kontrollversuchen in der vierten Stunde genau untersucht (Tabelle IX). Dabei stellte sich heraus, dass die Blutzucker-

TABELLE IX. Blutzuckercurve nach Durchschneidung eines Vagus am Hals. (bei gefesselten Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körper- gewicht (kg)	vord. Opera- tion.	Blutzucker (g%)								Maximale ab- solute Zu- nahme (g%)	Maximale re- lative Zu- nahme (%)	Seite der Vagotomie.
				nach d. Operation.										
				1 St.	2 St.	3 St.	10'	20'	30'	45'	60'			
9	1/IX 1929	2.300	0.095	0.205	0.203	0.207	0.199	0.202	0.207	0.242	0.240	0.035	11.9	rechts
10	2/IX "	2.050	0.083	0.160	0.165	0.170	0.175	0.177	0.190	0.191	0.197	0.027	15.9	links
11	3/IX "	2.100	0.100	0.133	0.127	0.109	0.102	0.097	0.090	0.095	0.103	0	0	rechts
12	4/IX "	2.200	0.085	0.122	0.111	0.097	0.102	0.100	0.095	0.097	0.100	0.005	5.2	links
13	6/IX "	2.350	0.077	0.140	0.131	0.136	0.132	0.144	0.141	0.133	0.130	0.008	5.9	rechts

TABELLE X. Elektrische Reizung eines zentralen Vagusstumpfes. (bei gefesselten Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körper- gewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Gereizte Seite	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten)			
			vor d. Opera- tion.	nach d. Operation.						Maximale absolute Zunahme (g%)								Maximale relative Zunahme (%)		
				1 St.	2 St.	3 St.	direct nach d.R.	10'	20'	30'	45'	60'								
14	8/IX	2,950	0,091	0,152	0,162	0,150	0,193	0,192	0,199	0,189	0,189	0,187	0,189	0,049	32,7	rechts	5	2		
15	9/IX	2,000	0,100	0,127	0,155	0,232	0,222	0,229	0,200	0,195	0,197	0,174	0	0	links	10	2			
16	10/IX	2,150	0,087	0,113	0,097	0,092	0,110	0,107	0,105	0,095	0,090	0,089	0,018	19,6	rechts	10	10			
17	11/IX	2,200	0,085	0,133	0,107	0,100	0,097	0,110	0,103	0,112	0,107	0,111	0,012	12,0	links	15	10			
18	13/IX	2,160	0,088	0,131	0,104	0,107	0,100	0,109	0,117	0,114	0,103	0,106	0,010	9,3	rechts	20	10			
19	16/IX	2,400	0,102	0,121	0,147	0,167	0,173	0,180	0,177	0,192	0,180	0,183	0,025	14,9	links	30	10			

steigerung in dieser Periode nicht ganz abklang, vielmehr bei drei Versuchen sogar noch ausgeprägter wurde. Dagegen klang die leichte Blutzuckersteigerung nach der Operation bei den freigelassenen Tieren schon nach 2 bis 3 Stunden vollständig ab. Nun zeigte die elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes, einerlei, welche Seite gereizt wurde, bei den beiden Versuchsarten keinen deutlichen Effekt. Abgesehen von drei Tieren (Kaninchen 14 und 19 der Tabelle X, Kaninchen 20 der Tabelle XI) überstieg die Blutzuckerzunahme kaum die Fehlergrenze. Auch von den besonders genannten Tieren zeigte nur ein Tier (Kaninchen 14) eine etwas deutlichere Blutzuckersteigerung (0,049 g%). Weil dieser Wert gerade beim gefesselten Tiere beobachtet wurde, und weil die Fesselung allein in dieser Zeitperiode fast dieselbe Blutzuckerzunahme hervorrufen konnte (Kaninchen 9 der Tabelle IX), so darf man auch diesem keine besondere Bedeutung beimessen.

2. Die elektrische Reizung des peripheren Vagusstumpfes.

Auch diese Versuche wurden an gefesselten und an freigelassenen Tieren ausgeführt. Wie aus den Tabellen 12 und 13 ersichtlich, steigerte sich der Blutzuckerspiegel bei den ersteren nach der Operation ziemlich deutlich. Da hier die elektrische Reizung erst 5 Stunden nach der Operation appliziert wurde, so wurde bei den Kontrollversuchen (Tabelle XII) die Blutzuckerkurve in der sechsten Stunde genau verfolgt, sodass man ersehen konnte, dass die Blutzuckersteigerung in dieser Zeitperiode noch nicht abklang, sondern in einem Versuch (Kaninchen 26) weiter verstärkt wurde. Nun wurde bei den behandelten Tieren der Blutzucker durch die elektrische Reizung kaum beeinflusst; von 6 Kaninchen zeigte nur ein Tier eine Blutzuckerzunahme von mehr als 0,02 g% (Kaninchen 32, Tabelle XIII). Da aber ein Kontrolltier in der entsprechenden Zeitperiode ohne elektrische Reizung eine stärkere Zunahme (0,039 g%) zeigte (Kaninchen 26, Tabelle XII), so darf man der oben erwähnten leichten Zunahme nach der Reizung keine besondere Bedeutung beimessen.

TABELLE XI. Elektrische Reizung eines zentralen Vagusstumpfes. (bei frei gelassenen Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Gereizte Seite.	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten).
			vor d. Operation.		nach d. Operation.												
			1 St.	2 St.	3 St.	direkt nach d. R.	10'	20'	30'	45'	60'						
20	26/IX 1929	2.060	0.091	0.135	0.110	0.095	0.115	0.103	0.107	0.100	0.093	0.090	0.020	21.1	rechts	5	2
21	26/IX "	2.300	0.096	0.112	0.100	0.099	0.107	0.103	0.105	0.110	0.103	0.090	0.011	11.1	links	10	2
22	7/X "	2.470	0.077	0.105	0.085	0.073	0.076	0.074	0.075	0.070	0.071	0.073	0	0	rechts	10	10
23	7/X "	2.120	0.085	0.127	0.095	0.090	0.100	0.097	0.099	0.095	0.088	0.080	0.010	11.1	links	15	10
24	8/X "	2.060	0.081	0.138	0.110	0.077	0.079	0.074	0.074	0.077	0.080	0.073	0.002	2.6	rechts	20	10
25	8/X "	2.100	0.083	0.122	0.111	0.087	0.085	0.076	0.074	0.075	0.071	0.073	0	0	links	30	10

TABELLE XII. Blutzuckercurve nach Durchschneidung eines Vagus unterhalb des Zwerchfells. (bei gefesselten Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)											Seite der Vagotomie.		
			nach d. Operation.													
			vor d. Operation.					10'	20'	30'	45'	60'				
			1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.							Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme(%)	
62	10/X 1929	2.080	0.097	0.100	0.178	0.190	0.187	0.180	0.183	0.219	0.199	0.182	0.194	0.039	21.5	rechts
72	11/X "	2.500	0.088	0.160	0.155	0.137	0.133	0.130	0.136	0.131	0.129	0.122	0.127	0.003	4.6	links
82	14/X "	2.200	0.075	0.132	0.102	0.100	0.089	0.085	0.099	0.080	0.085	0.090	0.083	0.014	16.4	rechts
92	15/X "	2.300	0.090	0.177	0.152	0.143	0.147	0.144	0.136	0.135	0.130	0.131	0.129	0	0	links
30	16/X "	2.100	0.072	0.125	0.150	0.146	0.141	0.137	0.145	0.135	0.139	0.130	0.135	0.008	5.8	rechts

Bei den frei gelassenen Tieren ging der durch die Operation einmal gesteigerte Blutzucker mit Ausnahme eines Tieres (Kaninchen 40, Tabelle XIV) schon nach 5 Stunden wieder auf den Anfangswert zurück. Bei der elektrischen Reizung, die nun appliziert wurde, blieb die Blutzuckerzunahme immer unter 0,010 g%, also innerhalb der Fehlergrenze (Tabelle XIV). Aus diesen Ergebnissen darf man schliessen, dass auch die elektrische Reizung des peripheren Vagusstumpfes keinen Einfluss auf den Blutzuckerspiegel ausübt.

3. *Mechanische und elektrische Reizung der Ischiadicusstümpfe.*

Schon nach meinen oben erwähnten Untersuchungen dürfte es sehr unwahrscheinlich sein, dass die Reizung des zentralen Vagusstumpfes eine Hyperglykämie hervorrufen kann. Aber einmal angenommen, dass dies tatsächlich der Fall sei, so muss doch untersucht werden, ob diese Hyperglykämie eine dem Reiz des zentralen Vagusstumpfes eigentümliche Erscheinung sei. Schon Houssay und Molinelli (1925) haben festgestellt, dass die elektrische Reizung des zentralen Stumpfes der Armnerven (nerfs brachiaux) oder des Nervus ischiadicus ebenfalls eine reflektorische Adrenalinsekretion hervorruft. Auch Sugawara und seine Mitarbeiter (1926) haben konstatiert, dass dieselbe Reizung des Nervus medianus die Adrenalinsekretion deutlich fördern kann.

Nun habe ich Untersuchungen über die Einflüsse der elektrischen Reizung der durchschnittenen Ischiadicusstümpfe auf den Blutzuckerspiegel angestellt. Die Versuche wurden nur an frei gelassenen Tieren ausgeführt. Zuerst wurde zwecks Kontrolle die Wirkung der einfachen mechanischen Reizung beobachtet, indem die Elektrode an den zentralen Ischiadicusstumpf angelegt wurde, ohne den elektrischen Strom einzuschalten. Diese Manipulation konnte bei drei Kaninchen eine maximale absolute Zuckerzunahme von 0,022–0,056 g% hervorrufen (Tabelle XV). Die elektrische Reizung, die jetzt an demselben Stumpf appliziert wurde, konnte keinen grösseren Effekt hervorrufen (Tabelle XVI), während die-

TABELLE XIII. Elektrische Reizung eines peripheren Vagusstumpfes unterhalb des Zwerchfells. (bei gefesselten Tieren).

Kaninchen. Nr. d.	Datum.	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Gereizte Seite.	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten).
			vord. Opera- tion.	nach d. Operation.													
				1 St. 2 St. 3 St. 4 St. 5 St.	direkt nach 10' 20' 30' 45' 60' d.R.					nach d. Reizung.							
31	18/X 1929	2.220	0.095	0.160 0.198 0.220 0.213 0.204	0.203 0.205 0.207	0.213	0.204 0.205					0.009	4.4	rechts	5	2	
32	20/X 1929	2.500	0.100	0.154 0.188 0.147 0.144 0.148	0.154 0.152	0.170	0.167 0.168 0.170					0.022	14.9	links	10	2	
33	22/X 1929	2.150	0.095	0.096 0.118 0.125 0.114 0.119	0.115	0.134	0.132 0.128 0.133 0.126					0.015	12.6	rechts	10	10	
34	23/X 1929	2.320	0.106	0.137 0.151 0.166 0.198 0.211	0.213 0.220 0.222	0.224	0.218 0.211					0.013	6.3	links	15	10	
35	26/X 1929	2.190	0.086	0.182 0.180 0.176 0.177 0.161	0.165	0.166	0.160 0.152 0.141 0.111					0.005	3.1	rechts	20	10	
36	27/X 1929	2.670	0.102	0.110 0.183 0.186 0.128 0.177	0.110 0.105 0.107	0.111	0.100 0.102					0	0	links	30	10	

TABELLE XIV. Elektrische Reizung eines peripheren Vagusstumpfes unterhalb des Zwerchfells. (bei frei gelassenen Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Gereizte Seite	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten)		
			nach d. Operation.																
			vor d. Opera- tion.		nach d. Operation.														
			1 St. 2 St. 3 St. 4 St. 5 St.		direkt nach d. R.		nach d. Reizung. 10' 20' 30' 45' 60'												
37	28/X 1929	2.160	0.085	0.124	0.121	0.106	0.100	0.099	0.097	0.099	0.096	0.100	0.101	0.097	0.002	2.0	rechts	5	2
38	30/X 1929	2.290	0.088	0.136	0.131	0.127	0.101	0.100	0.103	0.110	0.107	0.090	0.093	0.085	0.007	7.0	links	10	2
39	4/XI 1929	2.270	0.101	0.158	0.177	0.165	0.122	0.099	0.097	0.099	0.102	0.093	0.095	0.090	0.003	3.0	rechts	10	10
40	6/XI 1929	2.600	0.087	0.118	0.156	0.199	0.231	0.230	0.220	0.221	0.207	0.200	0.186	0.188	0	0	links	15	10
41	8/XI 1929	2.310	0.097	0.098	0.117	0.132	0.099	0.095	0.090	0.103	0.089	0.098	0.083	0.075	0.008	8.4	rechts	20	10
42	14/XI 1929	2.200	0.082	0.162	0.140	0.126	0.110	0.090	0.090	0.100	0.095	0.096	0.089	0.081	0.010	11.1	links	30	10

TABELLE XV. Mechanische Reizung eines zentralen Ischiadicusstumpfes.
(bei frei gelassenen Tieren).

Nr. d. Kaninchen.	Datum.	Körpergewicht (kg.)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme(%)	Gereizte Seite	Reizungsdauer (Minuten).
			nach d. Operation.					nach d. Reizung.								
			vor d. Opera- tion.	1 St. 2 St. 3 St. 4 St. 5 St.	direkt nach d.R.	10' 20' 30' 45' 60'										
43	22/XI 1929	2.350	0.096	0.163 0.165 0.147 0.128 0.110	0.146 0.157	0.166	0.150 0.143 0.135			0.056	50.9	rechts	10			
44	25/XI 1929	2.000	0.102	0.137 0.121 0.108 0.098 0.095	0.118 0.113	0.130	0.121 0.105 0.101			0.035	36.8	links	10			
45	30/XI 1929	2.410	0.085	0.131 0.155 0.185 0.177 0.170	0.192	0.188 0.165 0.155 0.147 0.145			0.022	12.9	rechts	10				
Mittelwert										0.038	33.5					

TABELLE XVI. Elektrische Reizung eines zentralen Ischiadicusstumpfes.
(bei frei gelassenen Tieren).

Nr. d. Kaninchen	Datum.	Körpergewicht (kg)	vor d. Opera- tion	Blutzucker (g%)						Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme(%)	Gereizte Seite	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten).
				1 St. 2 St. 3 St. 4 St. 5 St.	nach d. Operation	direkt nach d.R.	nach 10'	nach 20'	nach 30'	nach 45'	60'			
46	2/XII 1929	2.380	0.098	0.999 0.148 0.119 0.099 0.097	0.099	0.109	0.108	0.105	0.095	0.105	0.012	rechts	30	10
47	2/XII 1929	2.450	0.104	0.128 0.115 0.094 0.097 0.102	0.125	0.118	0.127	0.129	0.125	0.104	0.027	links	15	10
48	4/XII 1929	2.400	0.094	0.127 0.172 0.181 0.153 0.136	0.158	0.157	0.167	0.167	0.150	0.140	0.041	rechts	5	10
49	6/XII 1929	2.100	0.080	0.166 0.199 0.150 0.135 0.117	0.140	0.161	0.152	0.150	0.125	0.120	0.094	links	20	10
50	6/XII 1929	2.270	0.090	0.172 0.170 0.136 0.107 0.110	0.135	0.157	0.157	0.163	0.155	0.149	0.053	rechts	10	10
Mittelwert											0.035			
											31.5			

TABELLE XVII. Elektrische Reizung eines peripheren Ischiadikusstumpfes
(bei frei gelassenen Tieren).

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale		Gereizte Seite	Rollabstand (cm)	Reizungsdauer (Minuten)		
			vor d. Operation		nach d. Operation						absolute Zunahme (g%)		relative Zunahme (%)						
			1 St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.	direkt nach d.R.	10'	20'	30'	45'		60'					
51	9/XII 1929	2.300	0.099	0.120	0.135	0.105	0.095	0.097	0.098	0.090	0.094	0.091	0.097	0.090	0	0	rechts	5	10
52	9/XII 1929	2.100	0.085	0.179	0.163	0.152	0.144	0.140	0.137	0.135	0.109	0.110	0.100	0.095	0	0	links	20	10
53	11/XII 1929	2.400	0.089	0.114	0.110	0.164	0.101	0.092	0.102	0.097	0.088	0.085	0.078	0.079	0.010	10.9	rechts	30	10

selbe Manipulation am peripheren Stumpf ganz wirkungslos blieb. (Tabelle XVII.)

Aus diesen Versuchsergebnissen muss also geschlossen werden, dass der Hyperglykämie, die durch die Reizung des zentralen Vagusstumpfes verursacht werden könnte, keine dem Vagus eigentümliche Bedeutung beigemessen werden darf. Da bei unseren Untersuchungen in Wirklichkeit keine eindeutige Hyperglykämie durch den Reiz des zentralen Vagusstumpfes hervorgerufen wurde, und die Pilocarpinhyperglykämie auch nach der Vagotomie unverändert blieb bzw. noch verstärkt auftreten konnte, darf die letztere Erscheinung nicht durch die zentripetale Leitung des peripheren, durch Pilocarpin hervorgerufenen Vagusreizes erklärt werden.

II. BESTIMMUNG DER LOKALISATION DES ZENTRUMS FÜR DIE PILOCARPINHYPERGLYKÄMIE.

A. Einflüsse der Grosshirnexstirpation auf die Pilocarpin- und Adrenalinhyperglykämie.

Nachdem dem Vagus eine ätiologische Bedeutung für die Pilocarpinhyperglykämie nicht zukommt, gehe ich jetzt zur zweiten Frage über, nämlich der, wo das Zentrum liegt, dessen Erregung die Pilocarpinhyperglykämie verursachen kann. Zu diesem Zweck stellte ich zuerst Untersuchungen darüber an, wie dieselbe Hyperglykämie durch die Grosshirnexstirpation beeinflusst wird.

1. *Versuche mit Pilocarpin.*

Zwecks Kontrolle musste zuerst festgestellt werden, welche Einflüsse schon die Operation allein auf den Blutzucker ausüben kann. Wie die Tabelle XVIII zeigt, steigerte sich der Blutzuckerspiegel nach der Operation erheblich, ging aber in den meisten Fällen schon nach 6–7 Stunden, in allen Fällen nach 24 Stunden wieder auf den Wert vor der Operation zurück. Nach dieser Feststellung wurden die Pilocarpinversuche in der Weise vor-

TABELLE XVIII. Blutzuckerkurve nach der Grosshirnexstirpation.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)															Bemerkung
			vor. d. Operation	nach d. Operation (St.)														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15	24				
69	8/II 1930	2.770	0.032	0.195	0.243	0.285	0.262	0.222	0.199	0.195	0.146	0.163	0.104	0.122	0.113	Starke Blutung bei der Operation		
70	20/II 1930	2.320	0.085	0.177	0.211	0.193	0.162	0.130	0.111	0.097	0.092	0.087	0.080	0.082	0.081			
71	27/II 1930	2.700	0.087	0.163	0.120	0.089	0.080	0.078	0.081	0.087	0.080	0.085	0.082	0.089	0.085			
72	6/III 1930	2.080	0.105	0.203	0.175	0.126	0.115	0.118	0.095	0.104	0.105	0.107	0.110	0.105	0.108			
73	13/III 1930	2.200	0.082	0.143	0.111	0.086	0.081	0.081	0.075	0.072	0.085	0.080	0.090	0.087	0.099			

TABELLE XIX. Pilocarpinversuche bei grosshirnlosen Tieren.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (gr. %)								Maximale Zunahme absolute (%)	Maximale Zunahme relative (%)	Bemerkung
			vor d. Injektion	1 1/2	1	1 1/2	2	3	4	5			
74	4/II 1930	2.200	0.088	0.151	0.199	0.233	0.224	0.215	0.202	0.190	0.145	164.8	Kontrollversuch
"	7/II "	2.150	0.090	0.145	0.190	0.202	0.217	0.209	0.196	0.151	0.127	141.1	24 St. nach der Operation angestellt
75	4/II "	2.750	0.079	0.147	0.165	0.133	0.095	0.091	0.085	0.075	0.086	108.9	Kontrollversuch
"	9/II "	2.640	0.113	0.152	0.157	1 1/2 St. nach d. Injektion †							24 St. nach der Operation angestellt
76	14/II "	2.350	0.087	0.182	0.215	0.207	0.199	0.162	0.111	0.097	0.128	147.1	Kontrollversuch
"	21/II "	2.320	0.081	0.157	0.203	0.200	0.182	0.171	0.122	0.100	0.122	150.6	24 St. nach der Operation angestellt
77	24/II "	2.570	0.082	0.153	0.151	0.162	0.137	0.123	0.091	0.090	0.080	97.6	Kontrollversuch
"	28/II "	2.700	0.085	0.158	0.230	0.273	0.273	0.301	0.294	0.285	0.216	254.1	24 St. nach der Operation angestellt
78	26/II "	2.100	0.100	0.178	0.200	0.251	0.274	0.220	0.185	0.153	0.174	174.0	Kontrollversuch
"	7/III "	2.080	0.108	0.199	0.198	0.208	0.201	0.193	0.166	0.169	0.100	90.3	24 St. nach der Operation angestellt
Mittelwert			Vor d. Operation								0.132	145.9	
			nach d. Operation								0.141	159.0	

genommen, dass den Tieren, bei denen im voraus deutliche Pilocarpinhyperglykämie festgestellt wurde, das Grosshirn abgetragen, und 24 Stunden nach der Operation Pilocarpin subkutan injiziert wurde. Die Ergebnisse wurden in einer Tabelle XIX zusammengestellt. Von 5 Tieren ging ein Tier (Nr. 75) schon $1\frac{1}{2}$ Stunden nach der Pilocarpininjektion ein, sodass dieses Tier als Versuchsmaterial nicht in Betracht gezogen werden kann. Von den übrigen Tieren zeigten zwei (74 und 76) eine fast gleiche Blutzuckerzunahme sowohl nach als auch vor der Operation, eins (77) sogar eine viel stärkere Steigerung und ein anderes (78) eine geringere nach der Grosshirnabtragung. Also dürfte man mit Recht behaupten, dass die Pilocarpinhyperglykämie durch die Grosshirnabtragung keine besondere Veränderung erfährt.

2. *Versuche mit Adrenalin.*

Dieselben Versuche wurden auch mit Adrenalin an drei Kaninchen angestellt. Wie aus der Tabelle XX ersichtlich, zeigte die Blutzuckerzunahme durch Adrenalininjektion vor und nach der Operation¹ keinen Unterschied.

Aus diesen Versuchen an den grosshirnlosen Tieren ergibt sich, dass das Zentrum, das die Pilocarpinhyperglykämie hervorrufen kann, sich nicht im Grosshirn, sondern mehr kaudalwärts befindet.

B. Die Pilocarpin- und Adrenalinhyperglykämie bei dezerebrierten Kaninchen.

Die Tiere, die nach der oben beschriebenen Methode dezerebriert wurden, zeigten die sogenannte Dezerebrierungs-Starre an den Rumpf-, Extremitäten- und Schwanzmuskeln, die nach 1–2 Stunden wieder nachliess. Sie verloren auch das Bewusstsein und nahmen eine Seitenlage an. Die Atmung war fast normal und schien nur etwas tiefer zu sein.

1. *Versuche mit Pilocarpin.*

Zwecks Kontrolle musste zuerst untersucht werden, wie der

TABELLE XXI. Blutzuckerkurve nach Dezerebrierung.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)												Bemerkung
			vor d. Opera- tion	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	24	
54	25/XII 1929	2.190	0.098	0.172	0.253	0.269	0.195	0.190	0.197	0.201					7 St. nach d. Operation durch Blutung †
55	28/XII 1929	2.300	0.080	0.163	0.149	0.144	0.139	0.135	0.134						6 1/2 St. nach d. Operation durch Blutung †
56	21/XII 1929	2.250	0.082	0.158	0.235	0.247	0.176	0.174	0.172	0.134	0.110	0.081	0.065	0.078	
57	23/I 1930	2.070	0.081	0.165	0.174	0.188	0.199	0.200	0.200	0.172	0.152	0.122	0.105	0.085	
58	27/I 1929	2.100	0.093	0.189	0.188	0.141	0.201	0.197	0.200	0.205	0.168	0.135	0.131	0.117	

TABELLE XXII. Pilocarpinversuche bei dezerebrierten Tieren.

Kaninchen Nr. d.	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Bemerkung
			vor d. Injektion		nach d. Injektion (St.)										
			1/2	1	1 1/2	2	3	4	5						
59	16/XII 1929	2.260	0.086	0.152	0.184	0.203	0.166	0.127	0.105	0.087	0.117	136.0	Kontrollversuch		
"	22/XII "	2.250	0.078	0.075	0.073	0.080	0.077	0.077	0.075	0.067			24 St. nach der Operation angestellt		
60	21/I "	2.130	0.087	0.190	0.218	0.218	0.257	0.238	0.199	0.185	0.170	195.4	Kontrollversuch		
"	24/I "	2.070	0.085	0.083	0.078	0.085	0.093	0.089	0.085	0.080			24 St. nach der Operation angestellt		
61	23/I "	2.150	0.095	0.162	0.182	0.199	0.225	0.197	0.167	0.135	0.130	136.8	Kontrollversuch		
"	28/I "	2.100	0.117	0.120	0.125	0.122	0.130	0.126	0.111	0.106			24 St. nach der Operation angestellt		
62	23/I "	2.280	0.088	0.120	0.120	0.110	0.092	0.090	0.086	0.080	0.032	36.4	Kontrollversuch		
"	29/I "	2.200	0.086	0.091	0.083	0.080	0.087	0.086	0.085	0.090			24 St. nach der Operation angestellt		
63	29/I "	2.250	0.073	0.131	0.231	0.245	0.318	0.297	0.266	0.207	0.245	325.6	Kontrollversuch		
"	2/II "	2.160	0.060	0.059 0.055 0.062 0.059 0.054									15 St. nach der Operation angestellt 3 1/2 St. nach d. Pilocarpininjektion		
Mittelwert			Vor d. Operation										0.139	166.0	
			nach d. Operation												

Blutzuckerspiegel durch die Operation allein beeinflusst wurde. Wie die Tabelle XXI zeigt, trat bald nach der Operation eine deutliche Blutzuckersteigerung auf, die aber nach 10 bis 24 Stunden nicht mehr nachzuweisen war, sodass die Versuche mit Pilocarpin und Adrenalin in den meisten Fällen erst 24 Stunden nach der Operation, nur in einzelnen 15 Stunden nach derselben angestellt wurden. Was nun die Pilocarpinversuche betrifft, so zeigt die Tabelle XXII bedeutungsvolle Resultate. 5 Kaninchen, die vor der Operation eine deutliche Blutzuckerzunahme von 0,032–0,245 g% (Mittelwert 0,139 g%) zeigten, ergaben nach der Operation keine eindeutige Steigerung des Blutzuckerspiegels mehr.

2. *Versuche mit Adrenalin.*

Ganz im Gegensatz zu den Pilocarpinversuchen standen die Versuche mit Adrenalin (Tabelle XXIII), indem nämlich die Tiere auch nach der Operation durch Adrenalininjektion eine deutliche, wenn auch etwas schwächere Zunahme des Blutzuckers (0,069–0,175 g%, Mittelwert 0,115 g%) zeigten. Diese geringeren Ausschläge müssen wahrscheinlich den Einflüssen der eingreifenden Operation selbst zugeschrieben werden. Aber auch die vollständig negativen Ergebnisse der Pilocarpinversuche einfach durch die operativen Einflüsse zu erklären, muss als ausgeschlossen betrachtet werden, da die positiven Ergebnisse der Adrenalinversuche jedenfalls einen solchen Grad zeigten, dass man auch bei den Pilocarpinversuchen positive Resultate erwarten konnte.

Schon nach diesen Ergebnissen muss angenommen werden, dass das Zentrum, dessen Erregung die Pilocarpinhyperglykämie hervorruft, sich kaudalwärts vom Grosshirn einerseits, oralwärts von der Medulla oblongata andererseits befindet.

III. ÜBER DIE EINFLÜSSE DES ATROPINS AUF DIE ADRENALIN-HYPERGLYKÄMIE.

Die Versuche in diesem Abschnitt wurden eigentlich deswegen angestellt, um den Angriffspunkt des Atropins bei der Pilocarpin-

TABELLE XXIII. Adrenalinversuche bei dezerebrierten Tieren.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)								Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme(%)	Bemerkung	
			vor d. Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5				6
64	12/II 1930	2.130	0.098	0.148	0.242	0.249	0.261	0.264	0.234	0.227	0.168	0.122	169.3	Kontrollversuch
"	16/II "	2.230	0.131	0.157	0.170	0.169	0.175	0.178	0.198	0.200	0.162	0.144	52.7	15 St. nach d. Operation angestellt
65	12/II "	2.130	0.105	0.179	0.205	0.238	0.293	0.283	0.277	0.212	0.109	0.100	169.5	Kontrollversuch
"	16/II "	2.200	0.099	0.136	0.211	0.206	0.236	0.250	0.241	0.205	0.161	0.141	152.6	15 St. nach d. Operation angestellt
66	14/II "	2.300	0.098	0.165	0.200	0.211	0.242	0.292	0.321	0.310	0.264	0.149	228.6	Kontrollversuch
"	18/II "	2.150	0.103	0.123	0.156	0.173	0.179	0.207	0.202	0.194	0.191	0.188	101.0	24 St. nach d. Operation angestellt
67	19/II "	2.150	0.101	0.200	0.288	0.301	0.369	0.352	0.317	0.280	0.236	0.194	265.3	Kontrollversuch
"	2/III "	2.000	0.134	0.185	0.213	0.228	0.271	0.292	0.309	0.276	0.244	0.221	130.6	24 St. nach d. Operation angestellt
68	19/II "	2.290	0.100	0.216	0.253	0.319	0.333	0.320	0.221	0.251	0.128	0.090	233.0	Kontrollversuch
"	4/III "	2.200	0.102	0.117	0.137	0.153	0.154	0.171	0.180	0.167	0.148	0.135	76.5	24 St. nach d. Operation angestellt.
Mittelwert			Vor d. Operation								0.216	233.1		
			nach d. Operation								0.115	104.7		

hyperglykämie klarzustellen. Wie oben erwähnt, stellte sich bei meinen früheren Versuchen heraus, dass die Pilocarpinhyperglykämie nicht nur durch Ergotoxin, sondern auch durch Atropin verhindert werden kann. Weiter ergab sich aus den Versuchen in der vorliegenden Arbeit, dass die hemmende Wirkung des Atropins auf die Pilocarpinhyperglykämie mit dem Vagus gar nichts zu tun hat. Dann bleiben zur Erklärung der Atropinwirkung nur zwei Möglichkeiten übrig: Atropin kann entweder das Zentrum selbst oder die peripheren Endigungen der Splanchnici lähmen. Die erste Erklärung ist nach der allgemeingültigen Ansicht über die Atropinwirkung von Anfang an sehr unwahrscheinlich. Was die zweite Alternative betrifft, so muss man weiter erwägen, in welchem Verbreitungsgebiet die peripheren Splanchnicusendigungen gelähmt werden, weil sie zu verschiedenen Erfolgsorganen gelangen. Zur Klarstellung dieser Frage können die Untersuchungen über die Atropinwirkung auf die Adrenalinhyperglykämie beitragen. Nach Macleod (1908) kann Atropin die Hyperglykämie nach einer Splanchnicusreizung nicht unterdrücken. Wertheimer und Battez (1910) konnten den Effekt der Piqûre durch Atropin nicht verhindern. Auch McGuygan (1916) konnte den blutzuckersteigernden Effekt der Reizung des Plexus coeliacus mit Atropin nicht verhindern. Hinsichtlich der Adrenalinhyperglykämie beobachtete Saito (1921) bei Meerschweinchen mit kleiner Dosis von Atropin keine besondere Wirkung, bei solchen mit einer grossen vielmehr eine Verstärkung. Serefis (1924) beobachtete, dass bei Hunden die Adrenalinhyperglykämie durch Atropin früher eintrat, und er nahm an, dass der Organismus durch Atropin für die Adrenalinwirkung sensibilisiert würde. Auch Kinoshita (1926) konstatierte bei Kaninchen die fördernde Wirkung des Atropins auf die Adrenalinhyperglykämie. Dagegen konnten Papilian und Velluda (1926) bei Hunden mit Atropin die Adrenalinhyperglykämie teilweise verhindern.

Nun sollen unsere Versuche besprochen werden, die in den Tabellen XXIV und XXV zusammengestellt wurden. Bei den

TABELLE XXIV. Versuche mit Atropin und Adrenalin.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg)	Blutzucker (g%)										Maximale absolute Zunahme (g%)	Maximale relative Zunahme (%)	Bemerkung
			vor d. Injektion	1 ^{1/2}	1	1 ^{1/2}	2	3	4	5	6	7			
82	17/II X 1930	2.120	0.088	0.126	0.151	0.163	0.172	0.233	0.207	0.203	0.182	0.166	0.145	164.8	ohne Atropin
"	21/XII "	2.100	0.083	0.122	0.207	0.216	0.237	0.265	0.214	0.156	0.101	0.067	0.182	219.3	mit Atropin
83	17/XII "	2.350	0.098	0.165	0.232	0.275	0.302	0.308	0.234	0.174	0.151	0.133	0.210	214.3	ohne Atropin
"	21/XII "	2.350	0.102	0.160	0.232	0.262	0.268	0.311	0.256	0.180	0.160	0.101	0.209	200.4	mit Atropin
84	17X/II "	2.150	0.106	0.125	0.189	0.223	0.244	0.254	0.251	0.220	0.197	0.147	0.148	139.5	ohne Atropin
"	21X/II "	2.120	0.100	0.199	0.211	0.243	0.305	0.274	0.221	0.204	0.152	0.096	0.205	205.0	mit Atropin
Mittelwert			ohne Atropin										0.168	172.9	
			mit Atropin										0.199	208.4	

TABELLE XXV. Versuche mit Atropin und Adrenalin.

Nr. d. Kaninchen	Datum	Körpergewicht (kg.)	Blutzucker (gr. %)										Maximale absolute Zunahme(g%)	Maximale relative Zunahme(%)	Bemerkung	
			nach d. Injektion (St.)													
			Injektion	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	6	7				
82	17/XII 1930	2.120	0.088	0.126	0.151	0.163	0.172	0.233	0.207	0.203	0.182	0.166	0.145	164.8	ohne Atropin	
"	25/XII "	2.000	0.082	0.104	0.224	0.226	0.217	0.231	0.200	0.181	0.112	0.064	0.149	181.7	mit Atropin	
83	17/XII "	2.350	0.098	0.165	0.232	0.275	0.302	0.308	0.234	0.174	0.151	0.133	0.210	214.3	ohne Atropin	
"	25/XII "	2.330	0.093	0.147	0.246	0.257	0.293	0.309	0.292	0.211	0.100	0.085	0.216	232.3	mit Atropin	
84	17/XII "	2.150	0.106	0.125	0.189	0.223	0.244	0.254	0.251	0.220	0.197	0.147	0.148	139.6	ohne Atropin	
"	25/XII "	2.210	0.096	0.200	0.233	0.276	0.243	0.238	0.161	0.115	0.086	0.067	0.180	181.3	mit Atropin	
85	19/XII "	2.130	0.073	0.102	0.149	0.150	0.201	0.200	0.133	0.119	0.111	0.092	0.128	175.3	ohne Atropin	
"	24/XII "	2.140	0.073	0.146	0.168	0.213	0.200	0.185	0.126	0.085	0.070	0.034	0.140	191.8	mit Atropin	
86	19/XII "	2.110	0.082	0.103	0.121	0.167	0.203	0.199	0.198	0.127	0.105	0.081	0.121	149.6	ohne Atropin	
"	24/XII "	2.100	0.084	0.098	0.110	0.151	0.163	0.164	0.146	0.105	0.093	0.070	0.080	95.2	mit Atropin	
87	8/I "	2.050	0.089	0.128	0.172	0.222	0.231	0.236	0.201	0.195	0.181	0.144	0.147	165.2	ohne Atropin	
"	11/I "	2.100	0.087	0.126	0.164	0.186	0.207	0.211	0.186	0.139	0.107	0.063	0.124	142.5	mit Atropin	
88	8/I "	2.550	0.073	0.151	0.236	0.278	0.318	0.327	0.327	0.263	0.238	0.129	0.254	347.9	ohne Atropin	
"	11/I "	2.470	0.079	0.132	0.189	0.239	0.258	0.201	0.201	0.138	0.083	0.062	0.179	226.6	mit Atropin	
Mittelwert			ohne Atropin											0.165	193.8	
			mit Atropin											0.153	178.8	

Kaninchen wurde zuerst die Adrenalinhyperglykämie untersucht. Bei den Versuchen der Tabelle XXIV wurde nach 4 Tagen Atropin 5 Minuten, bei denen der Tabelle XXV nach 3 bis 8 Tagen dasselbe Gift 30 Minuten vor der Adrenalininjektion eingegeben. Bei der ersten Versuchsreihe war die Blutzuckersteigerung durch die vorausgehende Atropindarreichung etwas ausgeprägter, während sie bei der zweiten durch dieselbe Manipulation im Mittelwert etwas vermindert wurde. Wenn man aber die Ergebniss der Tabelle XXV im einzelnen betrachtet, dann wird man finden, dass nur zwei Tiere (Kaninchen 86 und 88) nach der Atropininjektion eine geringe Steigerung, dagegen die anderen Tiere fast dieselbe Blutzuckerzunahme wie vorher zeigten. Jedenfalls war von einer konstanten hemmenden Wirkung des Atropins auf die Adrenalinhyperglykämie gar keine Rede.

Also darf man schliessen, dass die Pilocarpinhyperglykämie in ihrem peripheren Wirkungsmechanismus mit der Adrenalinhyperglykämie nicht identifiziert werden kann. Wo das Atropin bei der Pilocarpinhyperglykämie angreift, soll weiter unten diskutiert werden.

DISKUSSION.

Wir wollen jetzt unsere Ergebnisse zusammenfassen und ihre Beduntung im einzelnen erwägen. Der Bequemlichkeit halber will ich dabei von der Frage des Zentrums ausgehen, dessen Erregung durch Pilocarpin eine Hyperglykämie hervorrufen kann. Entsprechend meinen Versuchsergebnissen wurde schon erwähnt, dass sich ein solches Zentrum kaudalwärts von den Grosshirnhemisphären einerseits, oralwärts von der Medulla oblongata andererseits befinden muss. Bevor man noch näher von der Lokalisation dieses Zentrums spricht, muss man zuerst die Tatsachen, die bis jetzt schon über die Zuckerzentren bekannt sind, in Betracht ziehen. Seit den grundlegenden Versuchen von Claude Bernard über den Zuckerstich ist die Tatsache des Vorhandenseins eines Zuckerzentrums in der Medulla oblongata fast von allen Seiten anerkannt.

Brugsch, Dressel und Lewy (1921, i, ii) machen für den Piquéreiz den vegetativen Oblongatakern verantwortlich. Nach ihnen können sogar an diesem Kern zwei verschiedene Teile unterschieden werden, indem im hinteren Teil desselben Sympathicuszellen für die Inbetriebsetzung der Nebennieren und damit für die Zuckermobilisierung, im vordersten Teile Vaguszellen für das Pankreas, also für vermehrten Glykogenaufbau liegen sollen. Neuerdings wurde aber gegen die Annahme eines Zuckerzentrums in der Medulla oblongata ein revolutionärer Vorstoß von Hiller (1930) gemacht, da er bei seinen Versuchen für diese Annahme nicht die geringsten Anhaltspunkte finden konnte. Wie weit seine Ansicht richtig ist, bedarf noch weiterer Nachprüfung. Bis dahin dürfte es richtiger sein, der hergebrachten Annahme eines Zuckerzentrums in der Medulla oblongata zu folgen. Diesem Zentrum ist noch ein anderes im Zwischenhirn übergeordnet. Nach den Untersuchungen von B. Aschner (1912), Leschke (1920) u.a kann dieses Zentrum in den Hypothalamus verlegt werden. Nach Brugsch, Dresel und Lewy ist das Zuckerzentrum des Zwischenhirns im Nucleus periventricularis zu suchen. Diesem Zwischenhirnzentrum soll nach Dresel und Lewy (1921) noch ein weiteres Zentrum im Striatum übergeordnet sein, weil nach ihnen bei vier Diabetikern starke Veränderungen im Globus pallidus gefunden wurden. Diese Angaben bedürfen noch sehr der Nachprüfung, worauf Toenniessen (1924) schon hingewiesen hat. Mit Sicherheit ist also zur Zeit nur ein Zentrum im Hypothalamus und ein solches in der Medulla oblongata angenommen. Wenn man nun diese bekannten Tatsachen zur Erklärung meiner Versuchsergebnisse anwenden will, so kommt nur das Zuckerzentrum im Zwischenhirn auch als Zentrum für die Pilocarpinhyperglykämie in Betracht, da die Tiere mit intakter Medulla oblongata nicht mehr auf die Pilocarpininjektion reagieren konnten, wenn das Zwischenhirn abgetrennt wurde.

Als nächste Frage steht zur Diskussion, ob das Zwischenhirnzentrum direkt durch Pilocarpin, oder indirekt auf irgendeinem anderen Weg gereizt wird. Wenn die Pilocarpinhyperglykämie,

wie aus meinen Untersuchungen ersichtlich, einerseits durch die Durchschneidung beider Vagi nicht verhindert werden, andererseits die elektrische Reizung des zentralen Vagusstumpfes keine eindeutige Hyperglykämie, die sich mit der Pilocarpinhyperglykämie vergleichen lässt, zur Folge haben kann, dann darf man die Ansicht von Maiho (1921) nicht teilen, dass diese Erscheinung durch die zentripetale Leitung der peripheren Erregungen des Vagus, die durch Pilocarpin hervorgerufen werden, reflektorisch verursacht werden kann. Die Anschauung von Saito (1921) und Allen, die die Ursache der Pilocarpinhyperglykämie in der Asphyxie, die zur Reizung des Zuckerzentrums führen kann, suchen will, dürfte auch nicht wahrscheinlich sein. Denn wenn diese Hyperglykämie tatsächlich auf solche Weise entstände, so ist schwer zu verstehen, warum sie nach der Dezerebrierung nicht mehr eintreten kann, trotzdem dieselbe Ursache, d.h. die Asphyxie, die jetzt das Zuckerzentrum in der Medulla oblongata reizen könnte, immer vorhanden sein müsste. Also dürfte sich ganz von selbst die Annahme ergeben, dass Pilocarpin das Zuckerzentrum im Zwischenhirn direkt erregen kann. Diese Erregungen müssen über das Zuckerzentrum in der Medulla oblongata durch die Splanchnici peripheriewärts übertragen werden.

Die sympathischen Fasern der Nervi splanchnici werden nach der Beschreibung von R. Greving (1924) zum Ganglion coeliacum geleitet. Die hier entstandenen postganglionären Fasern begleiten nun in den zahlreichen feinen Nervenbündeln des Plexus hepaticus die Leberarterie und gelangen mit dieser durch die Porta hepatis in die Leber. Auch die Nebennieren werden von den Nervi splanchnici innerviert (O. Renner, 1924). Also können die Erregungen, die durch die Splanchnici übertragen werden, direkt die Leberzellen erregen, oder indirekt durch die Adrenalinsekretion auf die sympathischen Nervenendigungen in der Leber übertragen werden. Für den Zuckerstich werden heutzutage im allgemeinen beide Wege angenommen. Nun muss erwogen werden, wie die Erregungen, die auch bei der Pilocarpinhyperglykämie durch die

Splanchnici nach der Peripherie geleitet werden, schliesslich auf die Leberzellen übertragen werden. Hier kommen nun meine früheren Untersuchungen über die Einflüsse der Nebennierenexstirpation auf die Pilocarpinhyperglykämie in Betracht. Dort wurde gezeigt, dass durch einzeitige Exstirpation beider Nebennieren die Pilocarpinhyperglykämie in ihrem Grade stark vermindert wurde, wenn sie auch nicht vollständig verhindert werden konnte. Diese Neigung war bei der zweizeitigen Exstirpation beider Nebennieren viel ausgeprägter, sodass der Mittelwert der absoluten Zuckerzunahme 0,023 g%, der der relativen 29,7% betrug. Da bei der einzeitigen Exstirpation Pilocarpin schon 1–2 Stunden nach der Operation injiziert wurde und die operativen Einflüsse nicht ganz ausgeschlossen werden konnten, muss den Ergebnissen der zweizeitigen Operation eine grössere Bedeutung beigemessen werden. Wenn man dabei das Intervall zwischen der ersten und zweiten Operation berücksichtigt, während dessen irgendein Kompensationsvorgang nicht ausgeschlossen werden kann, so darf man der geringeren Blutzuckersteigerung nach der zweiten Operation keinen grossen Wert zuschreiben, sodass ich annehmen möchte, dass die Pilocarpinhyperglykämie hauptsächlich indirekt durch die Adrenalinsekretion hervorgerufen wird. Nur so kann man leicht auch die Unterschiede zwischen Adrenalin- und Pilocarpinhyperglykämie erklären, dass nämlich die erstere nur durch Ergotoxin, die letztere dagegen ausser durch dieses Gift auch noch durch Atropin verhindert werden kann. Dabei muss der Angriffspunkt des Atropins in den sympathischen Nervenendigungen für die Nebennieren gesucht werden. Wie Gōhara (1920) an den glattmuskuligen Organen gezeigt hat, kann Atropin auch die befördernden sympathischen Nerven Elemente lähmen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Vagotomie scheint keinen grossen Einfluss auf den nüchternen Blutzuckerwert des Kaninchens auszuüben.
2. Die Pilocarpinhyperglykämie wird durch die Vagotomie

nicht verhindert.

3. Die Pilocarpinhyperglykämie wird dagegen durch Atropin auch nach der Vagotomie vollständig verhindert.

4. Die elektrische Reizung des zentralen bzw. peripheren Vagusstumpfes übt, einerlei an welcher Seite die Vagi gereizt werden, keinen nennenswerten Einfluss auf den Blutzuckerspiegel aus.

5. Durch die Abtragung beider Grosshirnhemisphären kann die Pilocarpinhyperglykämie nicht verhindert werden.

6. Die Dezerebrierung verhindert dagegen diese Hyperglykämie vollständig.

7. Die Adrenalinhyperglykämie kann durch Atropin nicht verhindert werden.

Nach diesen Versuchsergebnissen komme ich, auch unter Berücksichtigung meiner früheren Untersuchungen, zu folgendem Schluss über das Wesen der Pilocarpinhyperglykämie:

Die Pilocarpinhyperglykämie ist zentraler Natur. Das Zentrum befindet sich im Zwischenhirn und wird durch Pilocarpin direkt in Erregung versetzt. Diese Erregung wird über das Zuckerzentrum in der Medulla oblongata durch die Splanchnici peripheriewärts übertragen. Nun werden die peripheren Sympathicusendigungen für die Nebennieren gereizt. Durch die gesteigerte Adrenalinsekretion werden die sympathischen Nervenendigungen in der Leber weiter gereizt, wodurch es zum Glykogenabbau und schliesslich zur Hyperglykämie kommt. Das Atropin kann die Nervenendigungen für die Nebennieren lähmen und dadurch die Pilocarpinhyperglykämie verhindern.

LITERATUR.

- Amato, A. (1927): Riv. di patol. speriment., **2**, 37; Zit. nach Kongresszbl. f. d. ges. inn. Med., **46**, 333.
Allen, F. M.: Glycoruria and diabetes. Cambridge, Massachusetts.
Aschner, B. (1912): Pflügers Arch., **146**, 1.
Bernard. (1920): zit. nach Abderhalden, Lehrbuch d. physiolog. Chemie, **1**, 165.

- Britton, S. W. (1925): *Americ. Journ. Physiol.*, **74**, 291.
- Brugsch, Th., K. Dresel und Lewy, F. H. (1921, i): *Verhandl. d. 32. Congr. inn. Med.*, 144.
- Brugsch, Th., K. Dresel und Lewy, F. H. (1921, ii): *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.*, **25**, 262.
- Dresel, K., und Omonaky, F. (1927): *Zeitschr. f. d. ges. exp. Med.*, **55**, 371.
- DeCorral, (1918): *Zeitschr. f. Biol.*, **68**, 396.
- Dresel, K., und Lewy, F. H. (1921): *Berl. klin. Wochenschr.*, 739.
- Greving, R., (1924): *Die Lebensnerven von L. R. Müller*, Berlin.
- Gōhara, A. (1920): *Acta schol. medic. universitat. imper. in Kioto* **3**, 363.
- Hisamoto (1928): *Okayama-Igakkai-Zasshi*, **40**, 2476.
- Hoshi (1926): *Tohoku-Igaku-Zasshi*, **19**, 95.
- Houssay, B. A., et Molinelli, E. A. (1924): *Cpt. rend. Soc. Biol.*, **91**, 1056.
- Houssay, B. A., et Molinelli, E. A. (1925): *Cpt. rend. Soc. Biol.*, **93**, 881.
- Hiller, F. (1930): *Münch. Med. Wochenschr.*, 826.
- Inouye, T. (1929): *Nagasaki-Igakkai-Zasshi*, **7**, 255.
- Inouye, T. (1930): *Nagasaki-Igakkai-Zasshi*, **8**, 161.
- Inouye, T. (1928): *Nagasaki-Igakkai-Zasshi*, **6**, 570.
- Kendzierski, J. (1926): *Cpt. rend. Soc. Biol.*, **95**, 897.
- Kunika, T. (1927): *Nagasaki-Igakkai-Zasshi*, **5**, 839.
- Kusunoki, G. (1926): *Kyushu-Igakkai-Shi*, 297.
- Kinoshita, (1926): *Nihon-Naika-Gakkai-Zasshi*, **14**, 463.
- Kinoshita, (1926): *Chugai-Iji-Shinpo*, Nr. 1111, 880.
- Leschke, E. (1920): *Deutsch. med. Wochenschr.*, 959.
- Macleod, J.J.R. (1908): *Amer. Jour. Physiol.* **22**, 373.
- Maibo, G. (1921): *Kioto-Igakkai-Zasshi*, **18**, 143.
- Masamune, (1926): *Fukuoka-Ikadaigaku-Zasshi*, **19**, 29.
- McCormack and O'Brien, (1923): *zit. nach Macleod, British med. Journ.*, **11**, 165.
- McGuygan, (1916): *Jour. Pharmakol.*, **8**, 407.
- Morita, (1915): *Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakol.*, **78**, 188.
- Nakayama, M. (1924-25): *Jour. Biochem.*, **4**, 163.
- Papilian, V. et L. Funariu, (1926): *Cpt. rend. Soc. Biol.*, **94**, 159.
- Papilian, V. et C. Velluda, (1926): *Arch. internat. Physiol.*, **26**, 1.
- Renner, O. (1924): *Die Lebensnerven von L.R. Müller*, Berlin.
- Sakurai, T. (1926): *Jour. Biochem.*, **6**, 211.
- Saito, I. (1921): *Keio-Igaku*, **1**, 943.
- Schultze, O. (1900): *Arch. f. exp. Pathol. und Pharmakol.*, **43**, 193.

- Serefis, S. (1924): Zeitschr. f. d. ges. exp. Med., **43**, 438.
Sherrington, C.S. (1915): Jour. Physiol., **49**, Proc. Physiol. Soc, 52.
Sugawara, Watanabe und Saito (1926): Tohoku Journ. exper. Med.,
7, 1.
Toenniessen, E. (1924): Die Lebensnerven von L.R. Müller, Berlin.
Wertheimer (1910): E. et G. Battey, Arch. internat. Physiol., **9**, 363.

THE DETERMINATION OF OXYPROTEIC ACID IN URINE.

By

SHUSUKE HORIGUCHI.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University,
Director: Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for publication, May 1, 1931)

I. INTRODUCTORY.

Since in 1897 St. Bondyzuski and R. Gottlieb discovered oxyproteic acid in urine, its estimation has been worked out by many investigators. The methods can be classified mainly as follows.

I. Methods tried by Ginsberg (1907), Gawinski (1909), Salomon and Saxl. The principle of these methods remains the same in a large measure. The urine is treated first with excess of baryta to remove all insoluble barium salt. The excess of baryta is removed then by a current of carbon dioxide as barium carbonate. The filtrate of this precipitate is concentrated on the water bath to a syrupy consistency and an ether-alcohol mixture is added. The alcohol insoluble barium fraction thus produced is further purified by precipitation with mercury acetate from its soda alkaline solution. Oxyproteic acid is contained in this fraction and can be determined by its nitrogen content. In this case, however, a considerable amount of impurity is contaminated and the nitrogen contents reported by different authors diverge quite considerably, as is shown in the following:

Ginsberg	3.1-5%
Gawinski	4.5-6.8%

The main source of nitrogenous impurities in this precipitate was found to be urea.

II. Sassa (1914) tried, therefore, to remove urea from this fraction. He concentrated urine, after the addition of a requisite amount of sulphuric acid, on the water bath until the mass became syrupy. Infusorial earth was then added and the mixture was well pulverized. After the complete removal of urea by ether-alcohol extraction from this mixture, oxyproteic acid was precipitated with mercury acetate from its soda alkaline solution. The amount of nitrogen contained in this precipitate lies between 4.3-4.7% of total urinous nitrogen.

III. von Fürth (1915) removed urea from urine previously by the use of urease and from water soluble and alcohol insoluble barium fraction oxyproteic acid is precipitated with mercury acetate and soda. The nitrogen content amounted to 2.5-3.6% of total urinous nitrogen.

All of these methods are however, not only quite complicated, but require also a large amount of urine to give an exact result. They are therefore entirely impracticable for the examination of oxyproteic acid in urine excreted in a relatively short interval.

The author of this paper has succeeded in estimating the amount of oxyproteic acid in 100-300 cc. of urine with a fair exactness, the error fluctuating only within the limit of 4 per cent. The principle and the procedure of the method are described in the following paragraphs.

II. THE PRINCIPLE OF THE METHOD.

Inorganic sulphate, phosphate and other impurities in the urine are removed as insoluble barium salts by the addition of an excess of baryta into a certain definite amount of urine. The filtrate of these precipitates is concentrated, after the removal of excessive baryta as barium carbonate, on the water bath to a syrupy consistency and is increased with 20 times its volume of absolute alcohol. The precipitate thus produced is washed with alcohol. The filtrate and the alcoholic washings are concentrated on the water bath and the precipitation with alcohol is repeated. All

of these alcohol-insoluble barium salts are dissolved in water and the barium is removed by an adequate amount of sulphuric acid. With an aliquate portion of this filtrate the remaining sulphuric acid is precipitated by the addition of benzidine solution as benzidine sulphate and titrated with N/50 sodium hydroxide solution, using phenolphthalein as indicator. Another aliquote portion is calcined by the Benedict method to oxidize the neutral sulphur to sulphuric acid and the amount of sulphuric acid in this mixture is estimated also. The difference in the amount of sulphuric acid in these two portions gives the amount of oxyproteic acid sulphur.

III. METHOD OF PROCEDURE.

The volume of urine to be taken for the estimation is usually 200–300 cc. It is possible, however, even with 100 cc. to get an equally exact result.

1. Put 250 cc. of urine into a measuring flask of 300 cc. capacity, and add 40 cc. of hot saturated baryta, in case the specific density of the urine is above 1.015, or 3.5 cc. in case the density lies under 1.015. When the precipitate of insoluble barium salts settles down, add the distilled water to the mark and filter through dry filter paper into a dry beaker. Precipitate the excess of baryta by the current of carbon dioxide as barium carbonate and filter. Concentrate 250 cc. of the filtrate on the water bath about to 10 cc., the current of carbon dioxide being repeated if the solution becomes alkaline.

2. Remove the evaporating dish from the water bath and when cold, add 200 cc. of absolute alcohol. After the lapse of 30 minutes filter the precipitate of barium salt of oxyproteic acid through a glassfilter and wash the precipitate five times with 2–3 cc. of absolute alcohol each time. To avoid the loss of oxyproteic acid, concentrate the filtrate and washings and precipitate oxyproteic acid with absolute alcohol once more. This second precipitate of oxyproteic acid together with the first main mass of oxyproteic acid are dissolved in water in a 100 cc. measuring flask, and

dilute sulphuric acid is added until the reaction becomes slightly acidic and the flask, filled with distilled water up to the mark and filtered. This procedure removes the whole barium as barium sulphate with a slight excess of sulphuric acid.

3. With an aliquote portion of the filtrate estimate the amount of free sulphate by the benzine sulphate method.

4. With another aliquote portion of the filtrate the unoxidized sulphur is to be oxidized to sulphuric acid with copper nitrate after the method of Benedict.

5. If A cc. of the filtrate is used for the determination of oxyproteic acid sulphur under procedure 4, this corresponds to $\frac{250}{300} \times \frac{A}{10}$ of the original urine. Accordingly, if the difference in the amount of sulphur obtained under the procedure 4 and 3, i.e. the oxyproteic acid sulphur, is found to be B, the total oxyproteic sulphur in original urine (250 cc.) will be

$$B \times \frac{300}{250} \times \frac{100}{A}$$

Note i: The washing of barium salt of oxyproteic acid on the glass filter with 2-3 cc. of absolute alcohol described under procedure 2, was followed by the estimation of nitrogen in the alcoholic filtrate. The fourth washing was found free from nitrogen and washing five times was assumed to be enough.

Note ii: On the concentration of filtrate of barium carbonate in procedure 1, a small amount of yellow tinted barium carbonate may appear. It is not necessary to filter this precipitate off but it can be filtered together with the barium salt of oxyproteic acid without any inconvenience in the result.

IV. EXACTNESS IN THE ESTIMATION.

The method above described for estimating oxyproteic acid sulphur gives a result coinciding fairly well. This is shown in table I. A, B and C are different kinds of urine obtained on different days.

TABLE I.

The amount of oxyproteic acid sulphur (as H_2SO_4) in 250 cc. of urine.

Kind of urine	Date	No. of determination	Oxyproteic acid sulphur (as H_2SO_4) in mg
A	Nov. 28	1	19.4
		2	19.9
B	Dec. 1	1	25.4
		2	25.6
C	Dec. 12	1	26.3
		2	25.9
		3	26.6
		4	25.5
		5	26.3

As can be seen from the table, an amount, such as 25 mg can be estimated exactly, and the maximum error does not exceed 4%.

V. THE AMOUNT OF NEUTRAL SULPHUR AND OXYPROTEIC ACID SULPHUR EXCRETED IN DAILY URINE.

By the method above described I have determined the amount of oxyproteic acid sulphur contained in a day's urine of my own, together with the total nitrogen, total sulphate, inorganic and ethereal sulphate and neutral sulphur. The total sulphate was estimated by the Benedict-Fisk method, the inorganic and ethereal sulphate by the Folin method. The results are shown in table II.

As is shown in this table there is a daily variation between 110–198 mg of oxyproteic acid sulphur, averaging 150 mg. That the range of variation is fairly large is rather reasonable as the diet taken varied daily. The percentage of oxyproteic acid sulphur against total sulphate varied between 5–7.8%, averaging 6.14%; that against neutral sulphur varied between 52.8–75.8%, averaging 63%.

TABLE II.
Distribution of sulphur in urine excreted daily.

No.	Date	Amount of urine cc.	spec. grav.	total N mg	total H ₂ SO ₄ mg	Inorganic H ₂ SO ₄		Ethereal H ₂ SO ₄		Neutral H ₂ SO ₄		N S	Oxyproteic acid sulphur		
						mg	% total	mg	% total	mg	% total		mg	% total	% Neutral
1	23/Oct.	1550	1.016	14.655	2.537	2.233	83.58	125	6.10	179	10.32	5.78	130.3	5.14	72.7
2	24/Oct.	1470	1.014	11.978	2.837	2.371	83.58	173	6.10	293	10.32	4.22	179.9	6.34	61.5
3	19/Nov.	1750	1.014	11.005	2.069	1.739	83.73	154	7.74	177	8.53	5.31	123.2	5.99	64.5
4	28/Nov.	1400	1.016	11.211	2.182	1.917	87.85	109	5.02	155	7.13	5.13	110.2	5.05	70.9
5	1/Dec.	1750	1.015	11.638	2.611	2.199	84.20	95	3.66	317	12.14	4.46	178.6	6.84	56.3
6	7/Dec.	1650	1.015	12.659	2.636	2.154	81.71	145	5.49	338	12.80	4.80	178.2	6.74	52.8
7	12/Dec.	1900	1.013	11.957	2.554	2.070	80.58	144	5.66	352	13.76	4.68	198.4	7.77	56.5
8	8/Jan.	1300	1.016	11.403	2.382	2.087	87.59	105	4.37	191	8.02	4.79	139.4	5.85	73.0
9	15/Jan.	2050	1.010	10.523	2.330	2.089	89.66	80	3.45	161	6.90	4.52	121.9	5.23	75.8
Average		1.647		11.893	2.459	2.095	85.20	124	5.04	240	9.76	4.84	151.1	6.15	62.9

SUMMARY.

The method of estimation of oxyproteic acid in a relative small amount of urine is described. The error remains below 4%. It is not difficult to follow the amount of oxyproteic acid sulphur hourly with this method.

REFERENCES.

- Acree, S. F. (1906/7): *J. biol. chem.*, **2**, 135.
Bang, I.: *Lehrbuch der Harnanalyse*.
Benedict, S. R. (1909): *J. biol. chem.*, **6**, 363.
Benedict, S. (1911): *J. biol. chem.*, **8**, 499.
Benedict, S. R. (1910): *J. biol. chem.*, **8**, 499.
Bondyznski, St. Dombrowski, St. Panek, K. (1905): *Zeitschr. f. physiol. chem.*, **46**, 83.
Denis, W. (1910): *J. biol. chem.*, **8**, 401.
Dombrowski, St. (1907): *Zeitschr. f. physiol. Chem.*, **54**, 188.
Folin, O. (1907): *J. biol. chem.*, **3**, 81.
Folin, O. (1905/6): *J. biol. chem.*, **1**, 131.
Fürth, O. (1915): *Bioch. Zeitschr.*, **69**, 448.
Fürth, O.: (*Abderhaldens biol. Arbeitsmethode*, IV. Teils, S. 428-429.
Gawinski, W. (1909): *Zeitschrift f. physiol. chem.*, **58**, 458.
Ginsberg, W. (1909): *Hofmeister Beitrag*, **10**, 411.
Raiziss and Dubin (1914): *J. biol. chem.*, **18**, 297.
Sassa, R. (1914): *Biochem. Zeitschr.*, **64**, 195.
Weiss, M. (1910): *Biochem. Zeitschr.*, **27**, 175.

STUDIES ON THE EXCRETION OF NEUTRAL SULPHUR AND OXYPROTEIC ACID IN URINE UNDER SEVERAL DIFFERENT CONDITIONS.

BY

SHUSUKE HORIGUCHI.

*(From the Biochemical Institute, Tokyo Imperial University,
Director: Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for publication, May 1, 1931)

I. INTRODUCTORY.

All of the sulphur compounds found in urine are the metabolic products of protein in the body. The largest part, however, is due to that part of proteins, burned to supply energy, and the amount may be reduced by increasing the amount of sugar stuffs and at the same time reducing the amount of proteins in the diet. In this case the decrease is mainly found in inorganic sulphur, leaving the neutral sulphur almost untouched.

It is already known that neutral sulphur in the urine is the product of cell metabolism and its amount is proportional to the capacity and intensity of cell metabolism. The mechanism of its formation, however, is yet hardly known.

To elucidate these relations it is necessary first to observe by what conditions the excretion of neutral sulphur and oxyproteic acid sulphur in urine is influenced, and then to follow the possible pass in the study. In the following, some results of experiments on the study of the influence of several different conditions on the excretion of neutral and oxyproteic acid sulphur are reported.

II. METHOD OF THE EXPERIMENT.

The conditions given are described under each experiment. The urine is collected during a definite interval, differing from 5

hours to 24 hours according to each condition, and its content in neutral sulphur and oxyproteic acid sulphur is determined as follows:

1. Determination of neutral sulphur. The total sulphur is determined by the Benedict method, and the amount of inorganic and ethereal sulphate is determined by the Folin method. The difference in these two determinations is taken as neutral sulphur content.

2. Determination of oxyproteic acid sulphur. The oxyproteic acid sulphur is determined by the method reported formerly (Horiguchi, 1931). This consists in eliminating the inorganic sulphate by the addition of baryta to the urine, neutralizing the excess of baryta with carbon dioxide current, and in precipitating Barium salts of oxyproteic acids by absolute alcohol from their concentrated solution. The sulphur in the oxyproteic acid is oxydized to sulphuric acid by the Benedict method, and isolated as benzidine compound and titrated.

III. THE INDIVIDUAL VARIATION IN THE AMOUNT OF NEUTRAL SULPHUR AND OXYPROTEIC ACID SULPHUR EXCRETED IN URINE.

Five healthy young doctors kindly offered themselves as experimental subjects. All urinated at 12 A.M. and took 280 gm. of buttered bread, two eggs, (110–120 gm.) and a small amount of water. At the lapse of 5 hours, the urine was collected individually and its content in total nitrogen, total sulphur inorganic sulphate, ethereal sulphate, neutral sulphur and oxyproteic acid sulphur was determined. The results are shown in table I.

As is clear from the table, in healthy people, the amount of neutral shows only small individual variation. It is noteworthy, however, that M. I, who is a consistent smoker, excreted a larger amount of neutral sulphur.

TABLE I.

Name	No. of experiment	Volume of urine cc.	sp. g	total N	total H_2SO_4 mg	Inorganic H_2SO_4		Etheral H_2SO_4		Neutral H_2SO_4		N		Oxyproteic acid sulphur (as H_2SO_4)		
						mg	% total	mg	% total	mg	% total	mg	% total	mg	% total	% Neutr.
K. Y	1	215	1.022	2301	516	485	93.88	14	2.72	18	3.40	4.46	4.46	12.9	2.50	71.61
	2	365	1.017	2613	509	472	92.75	16	3.06	21	4.19	5.13	5.13	14.4	2.83	68.57
	3	570	1.010	3008	514	464	90.31	22	4.30	28	5.39	5.85	5.85	17.7	3.44	63.21
	average	383		2641	513	474	92.40	17	3.28	22	4.32	5.15	5.15	15.0	2.92	67.67
J. H	1	350	1.017	2622	657	614	93.42	14	2.09	30	4.49	5.16	5.16	20.0	3.04	66.67
	2	370	1.016	2751	579	529	91.48	16	2.51	35	6.01	3.99	3.99	22.3	3.86	63.71
	3	160	1.024	2551	546	517	94.60	10	1.88	19	3.51	4.75	4.75	12.0	2.20	62.36
	average	293		2631	594	553	93.10	13	2.19	28	4.71	4.43	4.43	18.1	3.04	64.30
M. I	1	410	1.017	2818	550	586	88.46	24	4.38	39	7.16	5.14	5.14	27.8	5.05	70.56
	2	525	1.016	3388	708	631	89.21	31	4.32	46	6.47	4.79	4.79	28.3	4.00	61.71
	3	370	1.018	2739	561	499	88.95	24	4.35	38	6.70	4.90	4.90	25.4	4.48	66.33
	average	435		2949	606	539	88.94	26	4.29	41	6.79	4.89	4.89	27.3	4.44	66.34
S. K	1	455	1.011	2656	611	545	89.19	36	5.84	30	4.96	4.35	4.35	17.8	2.92	58.86
	2	355	1.018	2560	638	567	88.78	43	6.69	29	4.53	4.00	4.00	20.0	3.14	69.19
	3	325	1.018	2534	637	580	91.09	25	3.89	32	5.12	3.98	3.98	22.8	3.58	71.34
	average	368		2583	629	564	89.67	34	5.40	31	4.93	4.11	4.11	20.2	3.21	66.43
S. H	1	310	1.018	2760	656	606	92.49	21	3.24	28	4.27	4.21	4.21	15.1	2.31	54.15
	2	370	1.016	2730	549	506	92.17	20	3.58	23	4.25	4.97	4.97	15.5	2.82	66.41
	3	585	1.010	2711	550	486	88.38	23	3.98	42	7.64	4.93	4.93	25.3	4.59	60.24
	average	355		2734	585	533	91.11	21	3.59	31	5.39	4.64	4.64	18.9	3.23	60.27

IV. THE AMOUNT OF NEUTRAL SULPHUR AND OXYPROTEIC ACID
SULPHUR EXCRETED IN URINE WHEN DIFFERENT
KINDS OF DIET WERE TAKEN.

Three different kinds of diet were chosen as follows:

Ordinary diet: 280 gm. of buttered bread, two eggs (110–120 gm.) and a small amount of water.

Sugar stuff diet: 200 gm. of cornstarch and 40 gm. of cane sugar and some water.

Three different kinds of diet were chosen as follows:

Ordinary diet: 280 gm. of buttered bread, two eggs (110 gm.) sugar and some water.

Sugar stuff diet: 200 gm. of corn-starch, 40 gm. of cane sugar, a small amount of table salt and some water.

Protein stuff diet: 250 gm. of lean beef, 100 gm. of potato, small amount of sauce. Beef was taken as beefsteak.

These meals were taken on the previous evenings, in the morning and at noon, and the urine was collected within 5 hours after the third meal. The author served as experimental subject. The results are shown in table II.

As is clear from this table the amount of nitrogen is the least in the corn starch meal, the greatest in the protein stuff meal, the ordinary meal lying in the middle. The amount of total sulphate and inorganic sulphate shows the same relation.

The amount of neutral sulphur, on the other hand, is not influenced much by the kind of meals. The tendency of the influence is, however, somewhat the same, being the least in sugar stuff meal, medium in ordinary meal and largest in protein stuff meal, although the degree of influence is very small.

The relation of oxyproteic acid sulphur is entirely different. The amount excreted is rather larger in sugar stuff diet than in ordinary diet. Accordingly the ratio $\frac{\text{Oxyproteic acid sulphur}}{\text{neutral sulphur}}$ is larger in sugar stuff diet than in ordinary diet. In the case

TABLE II.
The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine
after several different kinds of diet.

Kind of Diet	No. of experiment	Amount of urine cc.	sp. gr.	total N mg.	total H_2SO_4 mg.	Inorganic H_2SO_4		Etheral H_2SO_4		Neutral H_2SO_4		N/S	Oxyproteic acid sulphur		
						mg	% of total	mg	% of total	mg	% of total		mg	% of total	% of N
Ordinary meal Buttered bread, 28 gm. Eggs, 110 gm. Some water	1	310	1.018	2.760	656	606	92.49	21	32.4	28	4.27	4.21	15.1	2.31	54.15
	2	370	1.016	2.730	549	506	92.17	20	3.58	23	4.25	4.97	15.5	2.82	66.41
	3	585	1.010	2.711	550	486	88.38	23	3.98	42	7.64	7.64	25.3	4.59	60.24
	average	355		2.734	585	533	91.11	21	3.59	31	5.39	4.64	18.7	3.24	60.27
Sugar stuff meal Cornstarch, 200 gm. Cane sugar, 40 gm. Table salt, small amount	1	445	1.006	1.931	268	232	86.57	13	4.85	23	8.58	7.20	19.9	7.43	86.52
	2	785	1.002	1.747	259	219	84.56	14	5.41	26	10.03	6.75	22.4	8.64	86.15
	3	560	1.003	1.910	278	235	84.89	15	6.12	25	8.99	6.87	23.2	8.34	92.80
	4	810	1.002	1.639	147	123	83.67	8	5.45	16	10.88	11.14	13.6	9.25	85.00
	5	710	1.003	1.398	241	206	85.48	7	2.90	28	11.62	5.80	22.5	9.34	80.36
	average	662		1.725	239	205	85.77	10	4.16	24	10.07	7.21	20.3	8.49	84.56
Protein stuff meal Beef, 250 gm. Potato, 100 gm. Sauce, small amount	1	520	1.019	4.997	1.019	953	93.52	31	3.05	35	3.43	4.90	29.4	2.80	84.00
	2	385	1.024	5.519	1.422	1,294	91.00	60	4.22	68	4.78	3.88	56.1	3.95	82.50
	3	420	1.020	4.798	1.062	1,000	94.16	29	2.73	33	3.11	4.52	27.7	2.61	83.94
	4	460	1.023	5.113	1.262	1,195	94.69	32	2.54	35	2.77	4.05	29.4	2.33	84.00
	5	410	1.021	5.769	1.394	1,306	93.69	40	2.87	48	3.44	4.14	40.5	2.91	84.38
	average	439		5.239	1.232	1,150	93.34	38	3.09	44	3.57	4.25	36.6	2.97	83.18

of the beef meal, both the oxyproteic acid sulphur and the ratio of oxyproteic acid sulphur to neutral sulphur increased much more than in the ordinary diet.

The continuous taking of cornstarch meal and of beef meal needed very much effort and quite often caused nausea. The increase of oxyproteic acid and neutral sulphur excretion in these cases may perhaps be due to the increased function of the digestive organs.

V. THE AMOUNT OF NEUTRAL AND OXYPROTEIC ACID SULPHUR
EXCRETED IN URINE IN POSTABSORPTIVE STADIUM IN
NORMAL AND HYPERTHYROIDIC CONDITION.

In the previous sections we have seen that normal people, living in nearly similar conditions, excrete almost an equal amount of neutral and oxyproteic acid sulphur and that abnormal effort in the digestive tract causes an increased output of neutral and oxyproteic acid sulphur.

I have studied next the excretion of neutral and oxyproteic acid sulphur during postabsorptive period, where the function of digestive tract decreased to the minimum, in normal condition and also in hyperthyroidic condition. This experiment had in mind the desire to know about the influence of the thyroid hormone on the tissue metabolism. About the effect of thyroxin on the tissue metabolism there is a difference in opinion that either it only causes the increase of caloric metabolism and has no influence on the amount of nitrogen metabolism, or it affects greatly the proteic metabolism of tissues.

My experiments were performed in the following way. The author himself served as subject of the experiment.

1. *Pre-experimental period.* The urine was collected at a lapse of 15 hours after the ordinary meal for 5 hours, i.e. to 20th hour after the meal. The content in total nitrogen, total sulphate, inorganic and ethereal sulphate, neutral and oxyproteic acid sulphur was determined.

2. *First experimental period.* After each ordinary meal, 0.1 gm. of thyroidin (Sankyo) was taken. On the fourth day, before breakfast (15 hours after the last meal) the amount of oxygen consumption was determined by Krogh's respirometer. As the effect of thyroidin on the metabolic rate, as is shown in figure 1, became significant the urine was collected for 5 following hours and the determination was performed as before. The same collection of urine and the determination was repeated during the next 5 days; the taking up of thyroidin was continued after each meal.

3. *The second experimental period.* On the eighth day of the thyroidin period, the amount of oxygen consumption became highly increased, the function of heart and lung augmented very much, and other hyperthyroidismic symptoms became so manifest that the further intake of thyroidin was stopped. During a further 3 days the ordinary meal was taken. On the fourth day, the second experiment was begun. During this experiment, 200 gm. of cornstarch and 40 gm. of cane sugar were taken besides the ordinary meal. In the evening of the second day and in the morning of the 3rd day of this experiment, 0.1 gm. of thyroidin was taken, as the symptoms of hyperthyroidism had begun to lessen. In this experiment the urine was collected at the interval 15–20 hours after each evening meal and the determination of nitrogen and sulphur was performed just as above stated. The results of these experiments are given in table III and figure 1.

From the tables and figure the following facts may be perceived.

1. After 15 hours starvation the amount of neutral and oxyproteic acid sulphur and also the ratio
$$\frac{\text{Oxyproteic acid sulphur}}{\text{Neutral Sulphur}}$$
 remain the same as after the ordinary meal.

2. In hyperthyroidismic condition the amount of nitrogen excreted during 15–20 hours after the ordinary meal increases very much more than during the control period. The amount of total

TABLE III.
The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine in ordinary and hyperthyroid condition.

Amount of urine cc.	sp. g	Total N mg	Total H ₂ SO ₄ mg	Inorganic H ₂ SO ₄		Etheral H ₂ SO ₄		Neutral H ₂ SO ₄		N S	Oxyproteic acid sulphur		
				mg	% total	mg	% total	mg	% total		mg	% total	% of Neutr.
15-20 hours after the meal (normal condition)													
1	1.010	1.965	289	243	84.03	16	5.54	29	10.38	6.80	18.7	6.47	64.48
2	1.014	2.203	318	275	86.43	14	4.40	29	9.11	6.93	18.9	5.94	65.17
A. 3	1.015	2.508	323	271	83.90	17	5.26	35	10.83	7.76	22.7	7.03	64.86
4	1.016	2.748	376	309	82.18	28	7.61	39	10.37	7.31	25.6	6.97	65.64
average		2.373	326	275	84.36	19	5.83	32	9.81	7.28	21.5	6.59	67.19
15-20 hours after the meal (Hyperthyroid condition, ordinary meal)													
1	1.012	2.859	501	411	82.03	22	4.39	68	13.58	5.71	50.1	10.00	73.68
2	1.019	3.685	538	473	87.92	17	3.16	48	8.92	6.85	39.9	7.42	82.12
B. 3	1.013	2.963	443	378	85.33	13	2.93	52	11.74	6.69	42.7	9.64	82.12
4	1.020	2.947	499	436	87.37	12	2.40	51	10.23	5.96	42.0	9.48	82.35
average		3.114	495	425	85.86	16	3.15	54	10.99	6.29	43.7	8.83	80.93
15-20 hours after the meal (Hyperthyroid condition, supplementary diet)													
1	1.015	2.411	392	331	84.44	12	3.06	49	12.50	6.15	35.7	9.11	72.86
C. 2	1.018	2.256	453	373	82.34	15	3.31	65	14.35	4.97	45.9	10.13	70.62
3	1.010	2.728	527	432	81.97	21	3.94	74	14.04	5.18	59.3	11.25	80.14
average		2.465	457	379	82.93	16	3.50	62	13.57	5.39	47.6	10.41	76.77

Fig. 1.

The amount of oxygenconsumption and excretion of nitrogen and various kinds of sulphur.

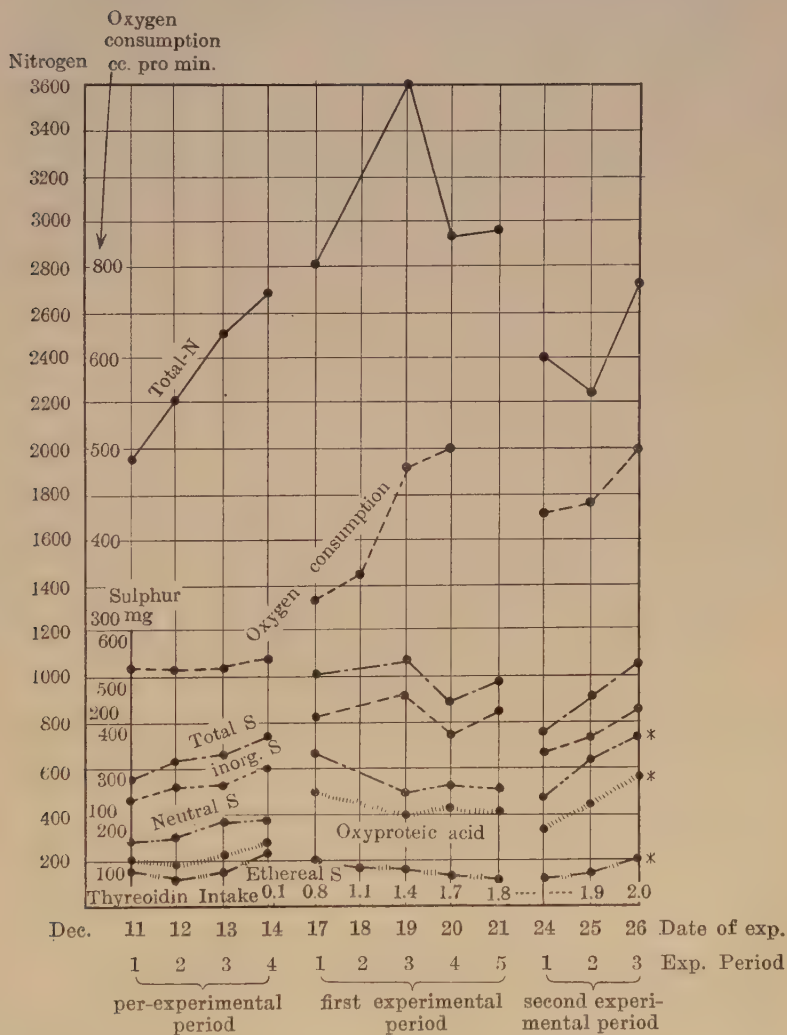
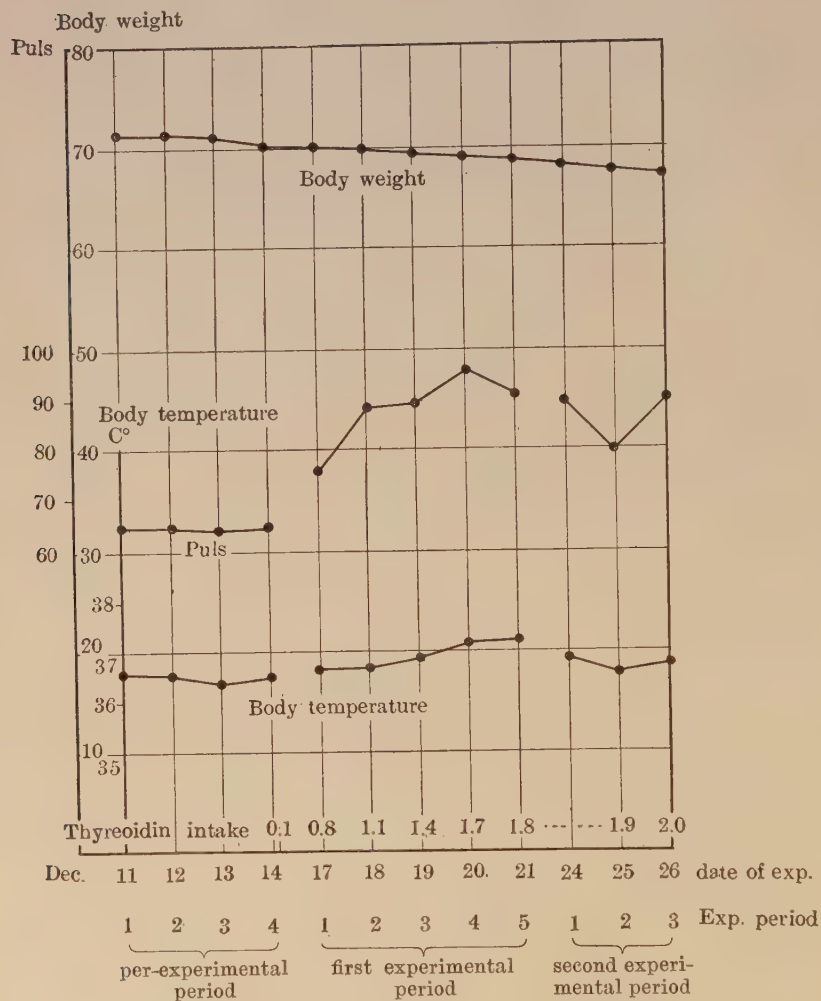


Fig. 2.

Body weight, pulse and body temperature in hyperthyroidic condition.



sulphur and inorganic sulphate increases in this case naturally. The content of neutral and oxyproteic acid sulphur and the ratio $\frac{\text{oxyproteic acid sulphur}}{\text{neutral sulphur}}$ are much more augmented than in the ordinary condition.

3. When 200 gm. of cornstarch and 40 gm. of cane sugar are taken besides the ordinary meal, the excretion of nitrogen in the urine decreases and shows a value nearly equal to the ordinary condition. The excretion of sulphur does not, however, decrease at all and increases very much more.

These three facts tell us that the thyroidin intake promotes the amount of energy expenditure of the body and increases the disintegration of body protein when the caloric value of the diet does not suffice. This increased protein degradation may be controlled by the supplementary intake of cornstarch. The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur does not decrease by the supply of extra sugar stuff in the diet. From this consideration it may be said that the effect of thyroid hormone on the tissue metabolism is not only quantitative, but it affects also the metabolism qualitatively.

VI. THE EXCRETION OF NEUTRAL AND OXYPROTEIC ACID SULPHUR IN URINE IN POST HYPERTHYROIDIC PERIOD.

In the preceding experiment it is shown that without any regard to the nature of the diet the amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine is very much increased in hyperthyroidic condition and the ratio of oxyproteic acid sulphur to neutral sulphur increases also.

This condition is maintained for a long time after the intake of thyroidin is discontinued. In the following, the result of analysis of urine collected on the 21st day and 35th day after the last experiment of the preceding section. During these days the ordinary diet was taken.

TABLE IV.

The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine
in post thyroidin period.

Week	Total N mg	Total H ₂ SO ₄ mg	Inorganic H ₂ SO ₄		Ethereal H ₂ SO ₄		Neutral H ₂ SO ₄		N S		Oxyproteic acid sulphur		
			mg	% of total S	mg	% of total S	mg	% of total S			mg	% of total S	% of neutral S
3	2.568	573	472	81.47	12	2.09	89	15.54	4.48	71.2	12.42	80.00	
5	2.090	528	446	84.42	16	3.03	67	12.55	3.95	54.8	10.37	83.30	

TABLE V.

The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine
in strenuous rowing exercise.

Date	No.	Volume of urine cc.	sp. g	Total N mg	Total H ₂ SO ₄ mg	Inorganic H ₂ SO ₄		Ethereal H ₂ SO ₄		Neutral H ₂ SO ₄		N S		Oxyproteic acid sulphur		
						mg	% of total S	mg	% of total S	mg	% of total S			mg	% of total S	% of neutral S
14/V	1	225	1.016	2.795	434	375	86.41	18	3.91	42	9.68	6.44	31.2	7.18	74.29	
15/V	2	320	1.014	2.477	416	357	85.81	18	4.33	41	9.86	5.95	30.0	7.21	73.17	
17/V	3	390	1.012	2.085	527	455	86.34	23	4.36	49	9.40	3.95	35.8	6.79	73.06	
average		312	1.014	2.452	459	395	86.06	20	4.35	44	9.59	5.34	32.3	7.02	73.41	

As is clear from the table, the amount of nitrogen became entirely normal and other hyperthyroidic symptoms quite lessened. The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur is, however, still prevalent.

VII. THE AMOUNT OF NEUTRAL AND OXYPROTEIC ACID SULPHUR EXCRETED IN URINE AT MUSCULAR LABOUR.

Next, I have examined the effect of muscular activity on the excretion of neutral and oxyproteic sulphur. The muscular labour consists of rowing exercise in pitch of 28–30 per minutes. The 3 minutes rowing were followed by 2 minutes rest, and this alternating rowing and rest were repeated for one hour. At 30 and 60 minutes the oxygen consumption was examined and the energy expenditure in both cases found to be 160 Cal. per hour per 1 sq. m. body surface area. The diet remained as ordinarily. The urine was collected for 5 hours succeeding the meal and the muscular labour was performed at the middle of this interval for one hour. The results are shown in table V.

As is clear from the table, the excretion of nitrogen and total sulphur remained normal.

The amounts of neutral and oxyproteic acid sulphur are, however, excreted in a larger amount than the normal. The ratio of oxyproteic acid sulphur to neutral sulphur was increased also above the usual value.

SUMMARY.

1. The amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine of healthy people taking the same meals shows only a minute individual variation.

2. In hyperthyroidic condition the excretion of neutral and oxyproteic acid sulphur increases in a large amount, without any regard to the amount of protein metabolised in the body. The ratio of oxyproteic acid sulphur to neutral sulphur is much augmented over the normal.

3. Indigestion of a large quantity of protein causes increase in the amount of neutral and oxyproteic acid sulphur excreted in urine. This may be due to the action of some amino acid in inducing the increased production of thyroid hormone.

4. In strenuous exercise, the amount of neutral and oxy-proteinic acid sulphur increases also in notable measure. Whether this is due to the production of some irritable stuff at the moment of muscular activity or to the product of muscular tissue itself can not be definitely stated.

REFERENCE.

Horiguchi, S. (1931): *J. of Bioch.* 14, 257.

SOME STUDIES ON ISOLATED LIVER CELLS.

I. On the durability of the vitality of isolated liver cells and their enzymes.

By

SHYOKICHI KODAJIMA.

(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.

Director: Prof. S. Kakiuchi.)

(Received for Publication, May 1, 1931)

I. INTRODUCTORY.

Among the vital phenomena occurring in nature there are unlimited cases of simplicity and complexity. Accordingly, the biochemical studies elucidating the relations between these phenomena must be concerned with possible divergent conditions. In the history of biochemistry the study of the total metabolism, i.e. the intake and output of substances to and from the body as a whole, developed early. The study of enzymes then became a subject of research of several investigators. This is quite conceivable, as both of these studies are rather simple: Simple to assume divergent processes occurring within the organism as a whole in the former case, and simple in chemical processes going on, in the latter. In the elucidation of exact processes in life phenomena, however, it is quite necessary to look into the chemical process within the cell and tissue, to study the mutual influence of cells or organs and many other things. Although the chemical processes going on within the isolated cells are of course no more than a natural process, they may contribute many valuable facts concerning the process within the body. With this consideration in mind, I have tried some investigations of isolated liver cells, the results of which are reported in this paper and in that directly following.

II. THE PREPARATION OF ISOLATED LIVER CELLS.

All the albino rabbits used for the experiment weighed 2,000–2,500 gm. and were kept for about a week with ordinary laboratory diet previous to the experiment. The animal was fixed on the plate and a canüle was inserted into V. Jugularis in the central direction. In perfusing gently a 0,85% NaCl solution, warmed at 38°, the vein was cut and let bleed freely. By patting cautiously the locus of the liver, the expelling of the blood in the liver was made as complete as possible. 1500–2000 cc. of sodium chloride solution were used for the washing of blood vessels. The liver was then immediately taken out (if it happened that the washing was not complete, the salt solution was perfused through V. Cava inferior) and was kept under the physiological salt solution in the ice chest at 8–10° and the salt solution was renewed daily at a definite time.

For the preparation of isolated liver cells the liver was cut and after confirming the absence of any abnormality in the cut surface, either the parenchym was shaved with a Gillette blade, or pieces of liver, about 2 cm thick, were pressed out through gauze, and the mass was suspended in the physiological salt solution and colated through two layers of gauze. These liver cell suspensions were centrifuged with 1500–2000 rotations per minute for 5 minutes; then the supernatant fluid was decanted off. To the residual cell paste was added a physiological salt solution, mixed well with a fine glass rod and centrifuged again. When this washing procedure was repeated for 15 times, the suspended liver cells were almost free from the other detritus mass and formed a conglomerate of 2–3 or 20 cells. If it happens that some amount of blood is mixed in liver cell suspensions it is only necessary to slow down the speed of centrifuge to 500 rotation. The liver cells precipitate, while blood cells remain in the supernatant fluid.

The amount of cells in the liver cell suspension thus isolated is estimated in a graduated centrifuge tube after centrifugation with 2000 rotations per minute for 10 minutes.

III. THE METHOD OF THE EXPERIMENT.

1. *Morphological survey of change in liver cells.*

The liver cells isolated as described in the preceding section lose their vitality with the lapse of time, the nucleus of the cell becoming unable to be stained by dyes. This was followed in our case by fixing a dried smear sample of this liver cell paste with methylalcohol and stained in diluted Giesma's solution (2 drops of original solution to 1 cc. of distilled water) for 60 minutes. The vitality of the cells was judged by the staining property of the cells.

2. *The determination of the action of hydrolytic enzyme of liver.*

Peptidase. In a measuring flask of 25 cc. of volume, 5.0 cc. of 10 times diluted liver cell suspension (i.e. 0.5 cc. of liver cell), 10 cc. of 1% Witte-pepton and 1.0 cc. of 1/15 mol. phosphate-buffer (pH=7.3), were mixed thoroughly, filled with physiological salt solution up to the mark, and 4 cc. of this mixture were used for the amino-N-determination by the Van Slyke method.

To the same mixture of liver suspension (5 cc.), pepton solution (10 cc.) and the buffer solution (1.0 cc.), were added 5 cc. of physiological salt solution and 1-2 cc. of toluol in 25 cc. measuring flask and after gentle mixing, were digested in an incubator at 38° for 24 hours. The contents were, after being cooled to room temperature, filled with physiological salt solution and 4.00 cc. of the well mixed content were used for Amino-Nitrogen determination.

The difference of these two determinations tells us the magnitude of the enzymic peptid hydrolyse during 24 hours. Its activity is expressed in our experiments, for convenience' sake, in the volume of nitrogen at the standard condition.

Antolytic enzymes.

i) The amount of nitrogen contained in 10 times diluted

liver cell suspension (=D. 1 cc. liver cell) was determined by Micro-Kjeldahl method. The titration was performed by the use of 1/100 n. NaOH solution.

ii) 5.0 cc. of 25 times diluted liver cell suspension (=0.2 cc. of liver cells) and 0.5 cc. of buffer solution (pH=7.3) were filled in a measuring flask of 50 cc. with 10% trichloroacetic acid to the mark. The nitrogen amount of the filtrate was determined by Micro-Kjeldahl method and it was found entirely free of nitrogen.

iii) The mixture of liver cell suspension and buffer solution as stated under ii) were added with 2.0 cc. of toluene in a large test tube and put into an incubator at 38° for one or two weeks with occasional shaking and supplementary addition of toluene. At the end of the experiment the mixture was transferred into a measuring flask of 50 cc. content and filled with 10% trichloroacetic acid exactly to the mark. The nitrogen content of the filtrate was determined by Micro-Kjeldahl method.

iv) From the result of determination i) and ii) the percentage of the rest of the nitrogen produced during the autolysis was calculated for the same amount of liver cells.

Liver Esterase.

For the determination of liver esterase activity the drop number method of Rona was used.

i) To the mixture of 30.0 cc. of saturated tributyrin solution, and 1.0 cc. of phosphate—buffer solution (pH 7.3) was added 1.0 cc. of 100 times diluted liver cell suspension (corresponding to 0.01 cc. liver cell) and shaken quite gently every 10 minutes; after 30 minutes, the drop number of the mixture was measured by the use of Traube's stalagmometer.

ii) On the other hand, the drop number of the tributyrin solution of different concentration was determined and a concentration drop number curve was constructed. From the number of drops of tributyrin mixture before and after the action of liver cells, the activity of liver-esterase can be calculated.

iii) In this experiment the presence of liver cell in the

tributyryn solution did not cause any difference in drop number from that of the solution, from which the cells were removed by centrifuge. The stalagmometric determination was, therefore, performed always in the presence of liver cells.

Amylase.

The activity of amylase was determined by the Wohlgemuth method.

i) To each of six (ten if necessary) test tubes, 5.0 cc. of 1% starch solution (1.0 of soluble starch was dissolved into 100 cc. of warme distilled water and after cooling filtered), 0.25 cc. phosphate buffer solution ($\text{pH}=7.3$) and 1 cc. of diluted liver cell suspension, containing different amounts of liver cell differing from 0.05–0.01 were taken. 2.0 cc. of toluene were added to each tube and all the tubes were put in an incubator at 38°C for 24 hours.

ii) Ten cc. of distilled water were then added to each tube and well shaken. 2 drops of 1/10 Iodine solution were dropped into each tube and limes of violet coloration were determined.

IV. THE STABILITY OF NUCLEUS STAINING OF PRESERVED
LIVER CELLS.

The isolated liver cells, prepared by the method described above, were put into an ice-chest and every day at the same hour the staining capacity of their nucleus was examined. The results are shown in table I.

As can be seen from the table, until 6–7 the day after the isolation the liver cells retain their ability of being stained by dyestuff and even on the ninth day the staining capacity is still over 90%. After that time, however, the staining ability becomes abruptly decreased and on the 14–15th day all nuclei are entirely unstained.

V. THE STABILITY OF PEPTIDASE IN ISOLATED LIVER CELLS.

The peptidase action of isolated liver cells was examined on every other day after the isolation at a definite time. The volumes

TABLE I.
The durability of nucleus-staining capacity.

Days after isolation	Rabbit No. 1			Rabbit No. 2			Rabbit No. 3			Rabbit No. 4		
	Completely stained	Incompletely stained	Unstained	Completely stained	Incompletely stained	Unstained	Completely stained	Incompletely stained	Unstained	Completely stained	Incompletely stained	Unstained
1	%	%	%	100			100			100		
2	100			100			100			100		
3	100			100			100			100		
4	100			100			100			100		
5	100			100			100			100		
6	100			100			100			100		
7	100			96	4		97	3		100		
8	99	1		91	9		97	3		98		2
9	95	5		91	2	7	98	2		91	3	6
10	91	7	2	81	12	7	90	9	1	85	10	5
11	69	24	7	54	39	16	78	15	7	58	30	12
12	11	56	33	9	56	35	72	19	9	48	31	21
13		9	91	—	—	—	3	64	33	9	51	40
14		7	93		24	73		20	80		7	93
15			100		8	92			100		4	93
16			100			100			100			100
17												100

of amino-nitrogen separated are shown in table II and figure 1.

As is clear from the table and figure the activity of liver peptidase declines quite slowly with the lapse of time.

VI. THE DURABILITY OF THE ACTIVITY OF AUTOLYTIC ENZYMES IN THE ISOLATED LIVER CELLS.

The activity of isolated liver cells at one week and two weeks after the extirpation of liver was examined in an incubator at 38° for a week or two weeks, the result of which is shown in table III.

TABLE II.

The change of peptidase activity during the preservation of liver cells.

Days after isolation	Rabbit No. 5	Rabbit No. 6	Rabbit No. 7	Rabbit No. 8	Rabbit No. 9
1	cc. 0.14	cc.	cc. 0.12	cc.	cc. 0.13
2		0.12		0.11	
3	0.12		0.11		0.11
4		0.12		0.09	
5	0.10				0.08
6		0.11		0.09	
7	0.09		0.08		0.06
8		0.10		0.06	
9	0.09			0.05	0.07
10		0.07	0.08		
11	0.08				0.05
12			0.07	0.04	
13					
14			0.04		

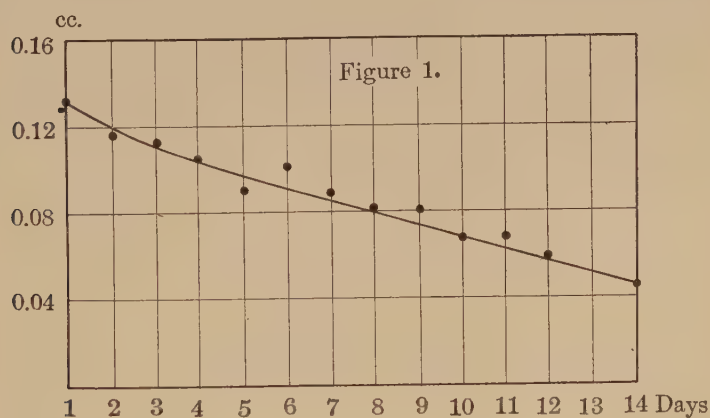


TABLE III.

The activity of autolytic enzymes of isolated liver cells after one and two weeks.

Days after isolation	Rabbit No. 5		Rabbit No. 6		Rabbit No. 7		Rabbit No. 8		Rabbit No. 9	
	One week's autolysis	Two weeks' autolysis	One week's autolysis	Two weeks' autolysis	One week's autolysis	Two weeks' autolysis	One week's autolysis	Two weeks' autolysis	One week's autolysis	Two weeks' autolysis
1 week	58.7	70.6	50.2	59.4	57.9	74.4	58.0	68.4	50.3	60.8
2 weeks	52.8	63.7	49.7	57.7	57.2	75.4	57.7	66.0	47.2	58.9

As is shown in the table the autolytic activity declines also at the end of 2nd week in comparison with that at the end of 1st week. The rate of declination seems, however, to be very slow.

VII. THE DURABILITY OF LIVER ESTERASE IN THE ISOLATED LIVER CELLS.

The activity of isolated liver cells in hydrolyzing tributyrin is determined every two days. The results are shown in table IV and figure 2.

As can be seen in table IV and figure 2 the activity of liver esterase declines the first 4 days quite abruptly. At a later period the decrease is rather slow, being perhaps due to the relatively unstable and relatively stable kind of liver esterase.

VIII. THE DURABILITY OF AMYLOLYTIC ACTIVITY OF ISOLATED LIVER CELLS.

The amylolytic activity of isolated liver cells was examined by Wohlgemuth, the result of which is shown in table V.

As is clear from the table, the activity of liver amylase is very stable and almost retains its activity for a long time.

TABLE IV.
*Percentage of tributyrin hydrolyzed by liver esterase with
 the lapse of time.*

time (day)	Rabbit No. 5		Rabbit No. 6		Rabbit No. 7		Rabbit No. 8		Rabbit No. 9	
	after 30'	after 60'	after 30'	after 60'	after 30'	after 60'	after 30'	after 60'	after 30'	after 60'
1	% 60	% 92	%	%	% 80	% 94	%	%	% 80	% 94
2			48	87			55	89		
3	35	65			33	62			52	84
4			34	61			46	76		
5	25	54							45	68
6			39	63			40	66		
7	25	50			25	44			43	68
8			24	35			40	65		
9	24	46							40	64
10			26	35	18	45	38	55		
11	16	34							41	65
12					18	45	28	47		
13										
14					18	44	31	50		

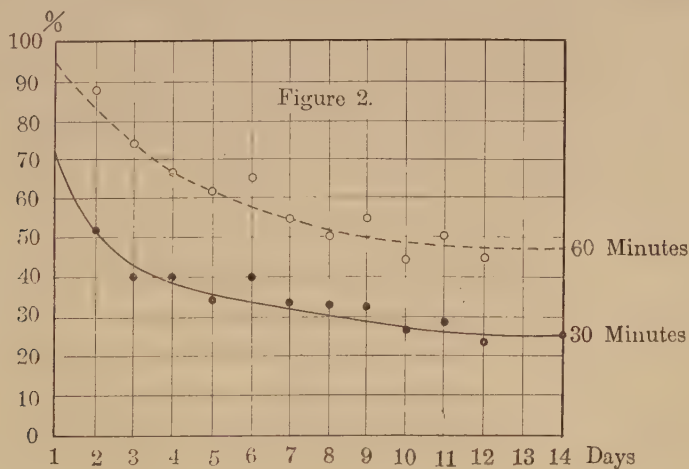


TABLE V.

The amylolytic activity of isolated liver cells at a different stage of preservation, expressed in D 38° 24h.

Days of Preservation	Rabbit No. 5	Rabbit No. 6	Rabbit No. 7	Rabbit No. 8	Rabbit No. 9
1	167		125		125
2		125		125	
3	167		125		125
4		125		125	
5	167				125
6		125		125	
7	167		125		125
8		125		125	
9	167				125
10		125	125	125	
11	125				125
12			125	125	
13					
14			125		

IX. GENERAL CONSIDERATIONS.

If we compare the results of experiments in the preceding sections it can be easily perceived that many of these hydrolytic enzymes retained their activity even when the nucleus failed to be stained. This is quite conceivable from the well known experience that these enzymes can be filtered and can act in the absence of cells.

The essential purpose of my experiments was to find the relation of the activity of aminoacidase to the nucleus—staining grade. All of my efforts concerning the action of aminoacidase of isolated liver cells, however, failed under every tried condition in regulating temperature, pH value and oxygen supply. Neither free ammonia nor urea was found to be increased.

SUMMARY.

1. The isolated liver cells retain their nucleus staining capacity for a week. The nucleus-staining ability seems then to begin to decrease. On the 15th day all nuclei are entirely unstained.

2. The activity of peptidase autolytic enzymes, esterase and amylase is retained very well in the preservation of isolated liver cells. The amylase was found most stable.

3. A part of esterase activity fades away in a relatively short time of preservation, while the remaining activity is quite stable.

4. The activity of hydrolases within the isolated cells is independent of the ability of nucleus to be stained.

5. It was impossible to find the activity of aminoacidase in the isolated liver cells.

SOME STUDIES ON ISOLATED LIVER CELLS.

II. On the effect of dye-stuffs on the vitality of isolated liver cells and on the activity of hydrolases within the cells.

By

SHYOKICHI KODAJIMA.

*(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. S. Kakiuchi.)*

(Received for Publication, May 1, 1931)

I. INTRODUCTORY.

In the preceding report it was confirmed that the ability of cell nucleus to be stained is retained for a week in the isolated liver cells, and also that the activity of many kinds of hydrolases within the isolated cells are almost independent of nucleus-staining ability of the cells. In the following experiments, I tried to study the effect of several kinds of dyes on the nucleus-staining property of isolated liver cells and on the activity of hydrolases within the cells. These experiments were performed because the effect on nucleus-staining may tell us about the toxicity of individual dye, while the effects of different dye-stuffs on the activity of hydrolases in the isolated liver cells may contribute some facts which elucidate the conditions prevailing within the cells.

II. DYE-STUFFS USED FOR THE EXPERIMENT.

All dye-stuffs used in my experiment were of Brüber and consisted of six basic and four acidic dyes. Each of these dyes was dissolved in a sodium chloride solution, isotonic with liver cells.

Basic dyes: Methylenblue, Toluidineblue, Matakitegreen, Methylviolet, Methylgreen, Neutralred.

Acid dyes: Benzopurpurin, Nigrosin, Ponceau, Trypanred.

III. THE EFFECT OF SEVERAL DYE-STUFFS ON THE VITALITY OF LIVER CELLS.

In each of the test tubes of 5 cc. capacity, were put 0.1 cc. of 0.1% dye-stuff of different kinds, 0.1 cc. of phosphate-buffer solution (pH=7.3) and 0.5 cc. of 10 times diluted liver cell suspension, and with the addition of physiological salt solution the total amount was made up to 1.0 cc. In this solution the concentration of dye was 0.01%.

These test tubes were placed in an ice-chest at 8–10° and after the lapse of 2, 4, 8 and 24 hours, some of the suspended liver cells were taken out and with the smear method and Giesusa-staining the ability of liver cell nucleus to be stained was examined, as was mentioned in the former paper (Kodajima, 1931). The results are shown in table I. The numbers of stained nuclei in per cent of total liver cells are recorded in the table.

TABLE I.
The effect of dye-stuff on the vitality of the isolated liver cells.

Kind of Dyes	Rabbit No. 12 Percent of stained nuclei afterwards				Rabbit No. 13 Percent of stained nuclei afterwards			
	2h	4h	8h	24h	2h	4h	8h	24h
Basic dyes								
Methylenblue	100	90	85	60	95	90	90	60
Toluidineblue	95	95	90	70	95	90	90	75
Malachitegreen	90	80	85	45	90	85	80	50
Methylviolet	100	100	95	80	100	95	90	80
Methylgreen	90	90	85	75	85	85	85	75
Neutralred	100	95	90	70	95	90	90	65
Acid dyes								
Benzopurpurin	95	85	70	60	95	85	55	45
Nigrosin	95	90	70	50	95	80	60	40
Ponceau	95	80	55	45	95	85	40	30
Trypanred	90	85	60	60	90	80	55	50

From the table the following facts may be observed.

1. Acid dyes affect much more the vitality of liver cells than basic dyes.

2. Among the basic dyes the least effective is methylviolet, succeeded by methylgreen and toluidine blue. Malachite green affects the liver cell the most.

3. Though all acid dyes are destructive to liver cells, trypan red and Benzopurpurin are the least effective among them. Ponceau, on the other hand, seems to be quite a destructive one.

As to the maintenance of osmotic pressure and pH-value of the system, the explanation of the difference of these dye-stuffs in the effect on liver cells has to be studied first from the behaviour of these dyes in the experiment in diffusion, absorption and imbibition experiments.

1. Diffusion velocity of the dye.

In each of beaker 10 cc. of 0.1% dye-stuff solution were taken and an upward closed water-filled glass tube of 6 mm caliber, and of 30 cm length was inserted. After 24 and 48 hours of standing still the length of coloured column in the tube was measured. The diffusion velocity of each dye was also compared in value of percent of one dye-stuff. The results are shown in table II.

If we compare the results in tables I and II, it will be found that there is no relation between the effect of dye-stuffs on the vitality of the isolated liver cells and the diffusion velocity of those dyes.

2. The comparison of the amount of dye-stuffs taken up by the isolated liver cells.

In each of 10 cc. test tubes 5.0 cc. of dye solution differing in concentration between 0.025–0.01%, 0.5 cc. of phosphate buffer and 0.5 cc. of 5 times diluted liver cell suspension (0.1 cc. of liver cell) were taken and after a gentle shaking were put in an ice-chest. After the lapse of three days each tube was centrifuged and the amount of dye in the supernatant clear solution was determined

TABLE II.
The diffusion velocity of dyes.

Kind of Dyes	Experiment 1				Experiment 2			
	Absolute amount		Relative amount*		Absolute amount		Relative amount*	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
Basic dyes	mm	mm	%	%	mm	mm	%	%
Methylenblue	31	41	100	100	32	43	100	100
Toluidineblue	24	33	77	80	25	36	78	84
Malachitegreen	26	34	84	83	26	37	81	86
Methylviolet	24	32	77	80	24	35	75	81
Methylgreen	18	24	58	59	20	26	63	60
Neutralred	29	38	94	93	28	39	88	91
Acid dyes								
Benzopurpurin	11	14	35	34	12	14	38	33
Nigrosin	15	21	48	51	15	24	47	56
Ponceau	19	25	61	61	18	26	56	60
Trypanred	18	25	58	61	18	27	56	63

*) . In relative amount that of methylenblue was taken at 100.

colorimetrically. The amount of dye taken up by the liver cell was calculated in per cent of original amount of dye in the solution. The results are shown in table III.

Benzopurpurin was entirely precipitated by centrifugation and the determination of the part which was taken up by liver cell became impossible.

If we compare the result of this experiment with that shown in table I, it may be found that there exists no direct relation between the amount of dye stuffs taken up by liver cells and the effect produced by these dyes on the vitality of liver cells.

3. Comparison of the amount of adsorption and imbibition of dye stuffs in isolated liver cells.

In the foregoing section it was elucidated that there is no

TABLE III.

The amount of dye taken up by liver cells.

Kind of dye-stuff	Concentration of the dye solution			
	0.01 %	0.0125 %	0.02 %	0.025 %
Basic dyes				
Methylenblue		71		63
Toluidineblue	90	90	91	81
Malachitegreen	97	91	93	86
Methylviolet	100	100	94	93
Methylgreen	60	64	60	44
Neutralred	83	80	76	74
Acid dyes				
Nigrosin	86	82	81	78
Ponceau	48	50	48	50
Trypanred	83	48	70	68

direct relation between the amount of dye taken up by liver cells and its effect on the liver cell vitality. The next step taken, therefore, was a comparison of the amount of adsorption and imbibition. In some of the dyes adsorption may be predominant, while in others, the entirely reverse circumstance may be present. In the study of these relations, I chose two basic and two acid dye-stuffs from dyes used in the preceding experiment. They were Methylviolet, Neutral red, Ponceau and Trypan red.

The experiment was performed in the same manner as described in the preceding experiment. The difference was in the time of determination of the concentration in the solution; namely, the centrifugation of liver cell and the colorimetric estimation of dye in the supernatant solution was made in two different stadiums. The first determination was made at 20 minutes, and in the second series of experiments, the determination was performed after 3 hours. The concentration of dye in the solution was expressed in a unit of 1/100 milli mol. The relation of the amount of dye taken up by liver cells to that remaining in the solution was expressed

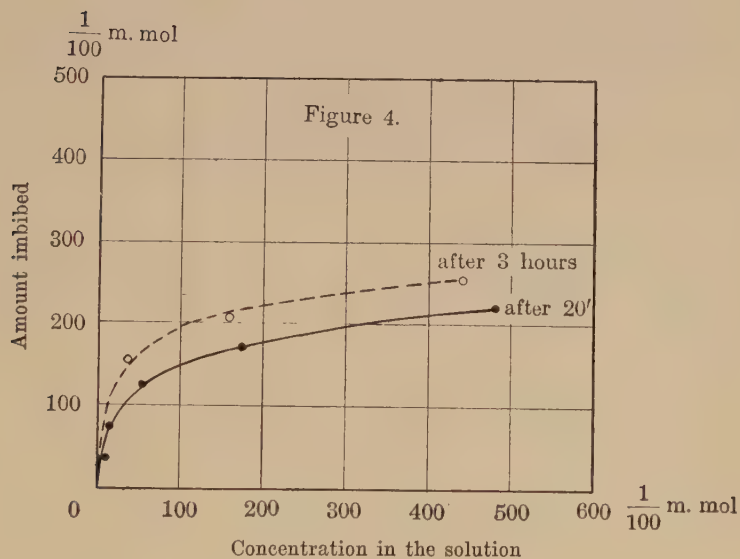
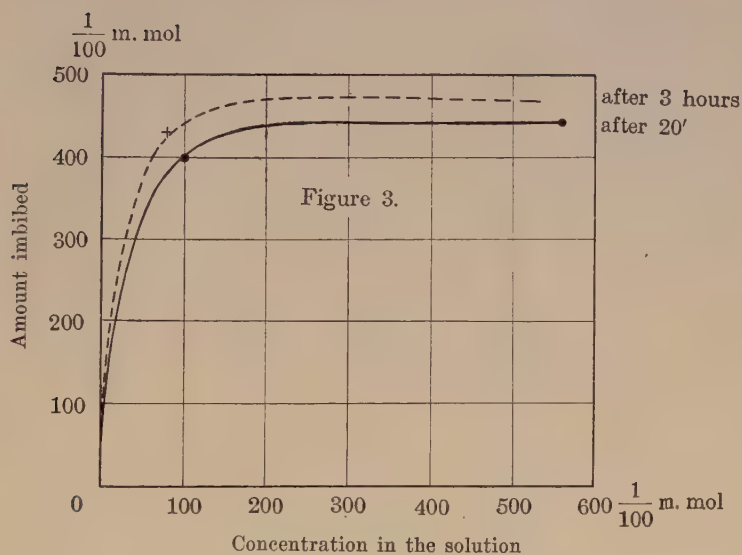
in the curve, in plotting the former in the ordinate and the latter in abscissa.

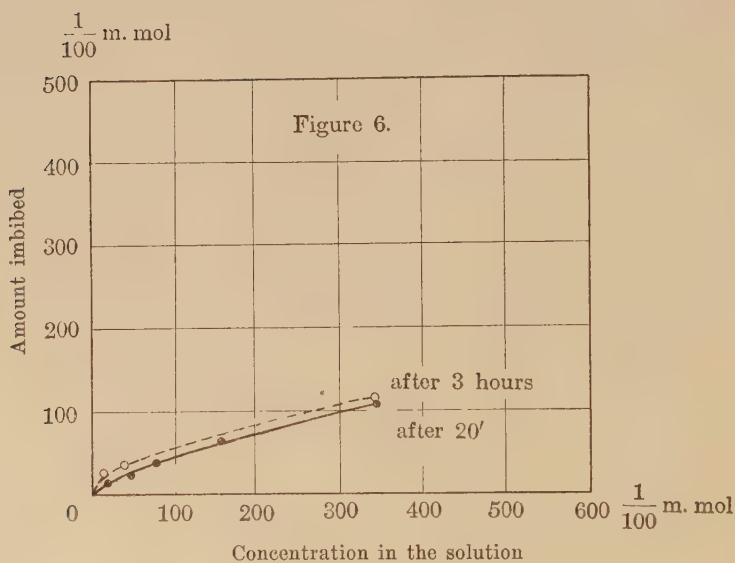
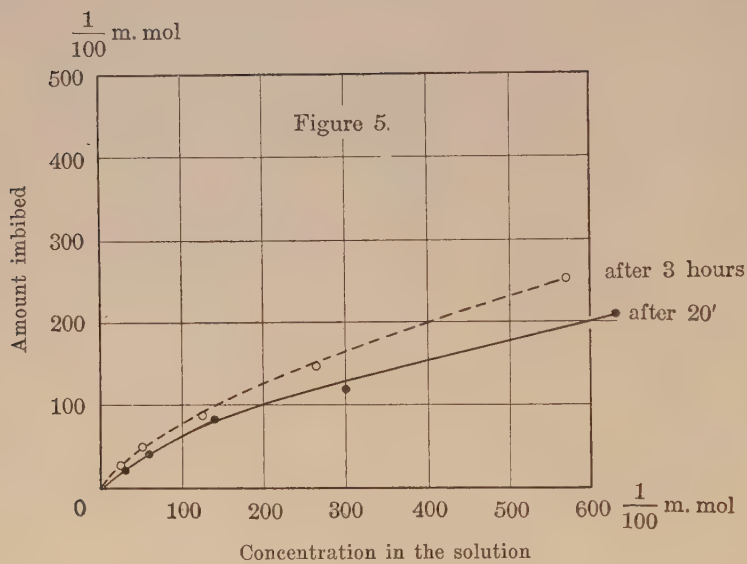
The results are shown in table IV and figure 3-6.

TABLE IV.

The amount of dye-stuffs taken up by liver cells after 20 minutes and 3 hours, in milli mol.

Kind of dyes	Experiment 1				Experiment 2			
	After 20'		After 3 hours		After 20'		After 3 hours	
	Taken up	Remain- ing	in cells	in solution	Taken up	Remain- ing	Taken up	Remain- ing
Methylviolet	447	553	468	532	449	533	470	542
	400	100	420	80	374	42	382	34
	229	21	230	20	197	11	197	11
	120	5	120	5	97	7	97	7
	60	3	61	2	49	3	49	3
Neutral red	220	480	260	440	133	450	147	436
	170	180	204	146	99	193	121	171
	129	46	159	16	68	78	92	54
	77	10	82	5	49	24	57	16
	40	4	40	4	29	7	30	6
Ponceau	208	624	257	575	107	239	137	209
	119	297	146	270	51	123	81	93
	75	133	83	125	28	58	41	46
	42	62	49	55	18	26	21	23
	23	29	26	26	9	12	10	11
	102	339	105	336	66	154	66	154
	63	157	65	155	22	69	24	67
	34	77	35	76	19	28	21	26
	20	35	27	28	13	13	14	9
	13	14	15	12	9	2	9	2





The adsorption on the surface of liver cells can be seen in the state of equilibrium, while the imbibition may take a long time to be complete. We may, therefore, assume the amount taken up by the cells at 20 minutes roughly as due to the adsorption, while the difference of value at 3 hours and that at 20 minutes may indicate the tendency of imbibition. From this consideration the results shown in table and figures give us the following facts.

	Adsorption	Imbibition
Methylviolet	strong	a little weak
Neutral red	a little weaker	stronger
Ponceau	weak	strong
Trypan red	weak	weak

Neutral red, which imbibes much more than methylviolet, affects greatly the vitality of the cell; the same relation is observed in Ponceau, which imbibits much and is more poisonous than trypan red.

IV. THE ACTIVITY OF THE HYDROLYTIC ENZYMES OF LIVER CELLS, WHICH WERE TREATED WITH DIFFERENT KINDS OF DYE-STUFFS.

In each of the test tubes of about 20 cc. of capacity 10 cc. of 0.1% dye solution of different kind, 1 cc. of phosphate buffer (pH=7.3) and 8.0 cc. of 8 times diluted liver cell suspension (5-7 days old) were taken and placed in an ice-chest at 7-10°. After 24 hours the mixtures were centrifuged, and the precipitated cells were twice washed with 10 cc. of physiological salt solution. The precipitated and washed stained liver cells were treated by the method described in the former paper for their activity of hydrolytic enzymes. In this experiment the control was made in which the physiological sodium chloride solution was used in place of dye. The results are shown in tables V, VI, VII and VIII.

TABLE V.
The activity of peptidase influenced by staining.

A. Amount of Amino-N

Kind of dyes	Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5
	cc.	cc.	cc.	cc.
Control	0.16	0.12	0.12	0.14
Methylviolet	0.145	0.11	0.11	0.135
Neutral red	0.16	0.12	0.115	0.135
Ponceau	0.12	0.085	0.10	0.115
Trypan red	0.14	0.10	0.11	0.125

B. The percentage of activity.

Kind of dyes	Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	Average
Control	100	100	100	100	100
Methylviolet	91	92	92	96	93
Neutral red	100	100	96	96	98
Ponceau	75	71	83	82	78
Trypan red	88	83	92	89	88

TABLE VI.
The activity of autolytic enzymes influenced by staining.

A. The percentage of residual nitrogen produced.

Kind of dye	One week's autolysis				Two weeks' autolysis			
	Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5
Control	% 50.4	% 55.7	% 51.1	% 54.9	% 62.3	% 64.6	% 68.2	% 64.7
Methylviolet	48.4	51.7	47.7	48.7	58.5	62.8	61.3	61.7
Neutral red	47.2	51.7	48.1	49.1	59.4	66.5	66.3	62.9
Ponceau	41.3	45.7	39.9	44.0	48.0	52.0	51.8	55.7
Trypan red	44.2	51.7	41.4	46.4	54.9	57.4	58.6	58.6

B. The percentage of activity.

Kind of dye	One week's autolysis				Average	Two weeks' autolysis				Average
	Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5		Rabbit No. 2	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Methylviolet	94	93	93	89	92	97	97	90	95	95
Neutral red	95	93	94	90	93	94	103	97	97	98
Ponceau	77	82	78	80	79	82	81	76	86	81
Trypan red	88	93	81	85	87	88	89	85	91	89

TABLE VII.

The activity of liver esterase influenced by staining.

A. The percentage of tributyrin hydrolysed.

Kind of dyes	After 30 minutes				After 60 minutes			
	Rabbit No. 1	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	Rabbit No. 1	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5
Control	38	36	26	29	65	59	45	48
Methylviolet	34	33	22	28	64	54	40	48
Neutral red	26	29	21	21	55	48	38	41
Ponceau	29	24	19	19	51	41	35	38
Trypan red	33	33	21	23	64	56	39	43

B. The percentage of activity.

Kind of dyes	After 30 minutes				Average	After 60 minutes				Average
	Rabbit No. 1	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5		Rabbit No. 1	Rabbit No. 3	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	
Control	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Methylviolet	89	92	85	97	91	98	92	89	100	95
Neutral red	68	81	81	72	76	84	81	84	85	84
Ponceau	76	67	73	66	71	79	70	78	79	77
Trypan red	86	92	81	79	85	98	95	87	90	93

TABLE VIII.
The activity of amylase influenced by staining.

A. Absolute value.

Kind of dye	Rabbit No. 1	Rabbit No. 2	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5
Control	143	143	143	143
Methylviolet	143	143	143	143
Neutral red	133	143	143	143
Ponceau	133	133	133	133
Trypan red	133	133	143	133

B. The percentage of activity.

Kind of dye	Rabbit No. 1	Rabbit No. 2	Rabbit No. 4	Rabbit No. 5	Average
Control	100	100	100	100	100
Methylviolet	100	100	100	100	100
Neutral red	93	100	100	100	98
Ponceau	93	93	93	93	93
Trypan red	93	93	100	93	95

From the tables the following facts can be observed:

1. The effect of basic dyes, as neutral red and methylenblue, on the activity of peptidase is quite insignificant, while the acid dye, especially Ponceau, retards the activity a great deal. The effect on the autolytic enzymes shows the same relation.

2. As regards to the effect of dye on the activity of liver esterase it is noticeable that neutral red has a very strong retarding action.

3. The effect of dye on the activity of amylase remains quite insignificant. The mode of influence is almost the same as in the case of peptidase.

4. As a whole acid dyes affect the activity of hydrolase much more than basic dye. Neutral red has a strong retarding action on liver esterase.

V. THE RELATION OF THE EFFECT OF DYE-STUFFS ON THE
STAINING ABILITY OF LIVER CELL NUCLEUS TO
THAT ON THE ACTIVITY OF HYDROLASE.

To study the relation of the effect of dye-stuffs on the staining ability of liver cell nucleus to that on the activity of hydrolase, the results of the preceding experiments are compared in table IX.

TABLE IX.

The comparison of the effects of dye-stuffs on liver cell nucleus staining and several hydrolases.

Kind of dyes	Nucleus-staining		Peptidase	Autolytic-enzymes		Liver-esterase		Amylase
	after 8h	24h		1 week	2 weeks	30'	60'	
Methylviolet	93	80	93	92	95	91	95	100
Neutral red	90	68	98	93	98	76	86	98
Ponceau	48	38	78	77	81	71	81	93
Trypan red	58	55	88	86	89	85	93	95

As can be seen from the table, the effect of dye on the nucleus staining of isolated liver cell goes almost parallel with that of dye on the activity of several hydrolases. It is, however, shown in the experiment of the preceding report that the staining ability of nucleus has no direct relation with the action of hydrolase. We can, therefore, assume that the dyes which affect the staining ability of nucleus, show directly the effect in the activity of hydrolase within the liver cells.

SUMMARY.

1. Acid dyes affect the vitality of isolated liver cells much more than basic dyes.
2. Amylase in isolated liver cells is most stable against the effect of dye-stuffs.

3. Dyes which imbibies the liver cell strongly, affect the vitality of liver cells and the activity of hydrolase.

4. Neutral red affects the hydrolysis of tributyrin within the isolated liver cells very significantly.

EIN BEITRAG ZUM STUDIUM DER EIGENSCHAFTEN DES PLASMAEWEISSES VOM QUERGESTREIFTEN MUSKEL.

VON

KINTARO YANAGI.

*(Aus dem Biochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)*

(Eingegangen am 5. Mai 1931)

EINLEITUNG.

Seitdem Fürth (1895) seine grundlegende Arbeit über die Eiweisskörper des Muskelplasmas veröffentlicht hatte, in der er die schon damals vorhandenen Resultate von Kühne, Danilewsky, Halliburton etc. übersichtlich zusammenfasste, ist eine Anzahl von Untersuchungen über das gleiche Thema publiziert worden.

Fürth unterschied im Muskelplasma drei verschiedene Eiweisskörper d. h. Myogen, Myosin und lösliches Myogenfibrin.

Die sehr nahe verwandten Eigenschaften des Myosins und des löslichen Myogenfibrins führten Fürth zuerst zur Vermutung, dass es sich in beiden Fällen um dieselbe Substanz handele, und das Myosin als ein Zwischenprodukt bei der Umwandlung des Myogens in lösliches Myogenfibrin zu betrachten wäre. Doch konnte er dies nie experimentell bestätigen, und war genötigt, das Myosin als von Myogen und Myogenfibrin verschieden zu betrachten und sich vorzustellen, dass das lösliche Myogenfibrin nur direkt aus dem Myogen unter bestimmten Bedingungen und nie aus dem Myosin entstehe.

Obwohl einige Autoren wie Danilewsky, Wladimiroff, u. a. eine einheitliche Beschaffenheit des Plasmaeiweisses im quergestreiften Muskel angenommen hatten, bekamen sie ihre Ergebnisse nur unter bestimmten von ihnen willkürlich ausgewählten Bedingungen.

Neuerdings hat sich Weber bemüht, diese Frage mit der präzise ausgeführten physiko-chemischen Untersuchung des Plasma-eiweisses zu erörtern. Leider scheint er die Eigenschaften der Myogenumwandlungsprodukte und des aus Pressrückstand hergestellten Myosins unter verschiedenen Bedingungen verfolgt und die Selbständigkeit des Myosins betont zu haben, um sich der Fürth'schen Einteilung anzuschliessen.

Der Zweck meiner Untersuchung war nun, etwas weiteres Licht auf diesem Gebiet zu gewinnen.

Der relative Zusammenhang der im Muskel vorhandenen Eiweisskörper lässt sich nur bei Ausschluss der bei der Bereitung der Extrakte hervorgerufenen Denaturation klar erkennen, und die Meinungsverschiedenheiten der bisherigen Autoren lassen sich wohl teils aus der Nichtberücksichtigung dieser Momente erklären.

Wie ohne weiteres klar, ist es unbedingt notwendig, Momente, welche die Denaturation veranlassen, insbesondere die Wasserstoffionenkonzentration und die Zusammensetzung der Elektrolyten der zur Extraktion gebrauchten Lösungen zu berücksichtigen. Auch die Geschwindigkeit der Denaturierung ist durch die Erniedrigung der Versuchstemperatur zu verlangsamen. Die Extraktion ist in möglichst niedriger Temperatur schnell durchzuführen und die Reaktion des Extraktes durch Gebrauch von stets gleich zur normalen Blut-H⁺-Konzentration gut gepufferter Extraktionsflüssigkeit gleichmässig zu gestalten.

METHODIK.

Ein männliches weiss-haariges Kaninchen von etwa 3 kg Körpergewicht wurde aus der A. carotis entblutet und, nach sofortigem Ausräumen der Baucheingeweide, von der Bauch-aorta oder einseitigen Darmbeinarterie aus durchspült, bis die von der entsprechenden Vene ausströmende Spülflüssigkeit ganz wasserklar und fast frei von Eiweissreaktionen wurde.

Als Spülflüssigkeit wählte ich eine Art von Ringer-Lösung von folgender Zusammensetzung:

NaCl	0.80%
CaCl ₂	0.02%
MgCl ₂	0.01%
KH ₂ PO ₄	0.02%
Na ₂ HPO ₄	0.10%

Ihre Reaktion, elektrometrisch geprüft, war bei P_H 7.21 gut gepuffert, und ihr osmotischer Druck gegen Kaninchen-Erythrozyten ganz leicht hypertonisch.

Diese Lösung wurde in eine Glasflasche von 3 Liter Inhalt aufgenommen, und darin Sauerstoff aus einer Bombe in solcher Menge eingeblasen, dass die mit Sauerstoff gesättigte Lösung immer einen konstanten Überdruck von etwa 120 cm Wassersäule behielt. Dieser Überdruck entspricht ungefähr dem Blutdruck in den Femoralarterien von Kaninchen. Die Flasche wurde in Kältegemisch von Eis und Kochsalz eingetaucht, und die Lösung blieb immer bei 0° – $2^{\circ}C$.

Die blutfrei gespülte Schenkelmuskulatur wurde sofort sauber herausgeschnitten, von Fett und Faszien befreit und in einem dicken Porzellanmörser mit flüssiger Luft bis zum Halbfrieren zusammengebracht.

Die Zeitdauer vom Entbluten an bis zum Ende der Herausschneidung des Muskels betrug immer 25–30 Minuten, die Menge der gebrauchten Spülflüssigkeit 1500–2000 ccm. Dann wurden die Stücke mit der Scheere fein zerschnitten, wieder mit flüssiger Luft hart gefroren und fein zerdrückt. Dies Gefrieren und Zerdrücken wurde mehrere Male wiederholt, bis der Muskelbrei sehr fein geworden war, worauf man ihn nochmals gut mahlte und verfeinerte.

Mit einem kleinen Teil (1–2 g) des Muskelbreis wurde die Trockensubstanz gemessen, und mit einer grösseren Menge (10–100 g) des übrig gebliebenen der Extrakt des Muskelplasmas folgendermassen zubereitet:

Der abgewogene Muskelbrei wurde mit dem ungefähr gleichen Volumen Ringer-Lösung unter stetem Umrühren verdünnt und

nach einer Weile dekantiert. Der Rückstand wurde abermals unter den gleichen Bedingungen etwa 4–5 mal extrahiert. Die gesamte Extraktmenge wurde dann durch ein feinmaschiges Seidentuch (Habutaye genannt) filtriert, und der Rückstand mit demselben Tuch unter der Handpresse ausgepresst.

Die Extraktion war als fast vollkommen zu betrachten, da der zuletzt ausgepresste Extrakt nur ganz spurweise Eiweissreaktion zeigte; der letzte Rückstand im Seidentuch wurde sorgfältig ohne Verlust zusammengekratzt, auf getrocknet gewogenes Filterpapier übertragen, mit destilliertem Wasser salzfrei gewaschen, dann mit absolutem Alkohol und Äther gut entwässert, dann auf 105°C getrocknet und gewogen.

Der Extrakt wurde sofort oder nach Filtrieren durch Filterpapier untersucht, sonst unter Toluolzusatz im Eisschrank aufbewahrt.

Die Reaktion der verschiedenen Lösungen wurde mit Bromthymolblau als Indikator gegen ein seinerseits elektrometrisch geeichtes Phosphatgemisch nach Sørensen kolorimetrisch ermittelt.

Die Hitzeaktionierung wurde in einem grossen, genau temperierten Wasserbad ausgeführt. Die dabei angewandte Temperatur war in einem mit Ringer-Lösung gefüllten Reagenzglas von derselben Höhe wie die in der Versuchsepruvette.

Die Dialyse wurde mit dem Kollodiumbeutel oder der tierischen Membran, unter Toluolzusatz sowohl innerhalb wie ausserhalb der Membran, im Eisschrank oder bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Ergebnisse.

I. PRÜFUNG AUF EINE ETWAIGE AUTOLYSE WÄHREND DES VORBEREITUNGSVERFAHRENS.

Obwohl ich für die Muskelspülung eiskalte, mit Sauerstoff gesättigte, fast neutral gepufferte Ringer-Lösung gebrauchte, schien es doch nicht ganz überflüssig, eine Prüfung zum Ausschliessen einer etwaigen Autolyse auszuführen.

Also habe ich den Gesamt- und Reststickstoff, die Trockensubstanz und den Hämoglobingehalt des frisch entbluteten Muskels, dem noch Blut beigemischt war, einerseits und des mit Ringer-Lösung vollkommen blutfrei gespülten Muskels anderseits bestimmt, und die entsprechenden Werte an dem Blut auch ermittelt. Aus den gewonnenen Zahlen erreichte ich die Menge des Reststickstoffes im gespülten Muskel, subtrahierte davon die im frisch entbluteten Muskel, indem ich dabei die Rest-N-Menge aus dem Blut in Betracht zog, und fand niemals eine Zunahme im gespülten Muskel. Daneben überzeugte ich mich auch von der Möglichkeit, bei eiskalter Behandlung die Autolyse während noch weiterer 30 minutiger Aufbewahrung ganz vermeiden zu können.

II. EXTRAHIERBARKEIT DES MUSKELPLASMAS DURCH VERSCHIEDENE LÖSUNGEN.

Bei den meisten Versuchen habe ich die oben angegebene gepufferte Ringer-Lösung als Extraktionsmittel gebraucht, um die Denaturierung der Eiweisskörper möglichst zu vermeiden. Doch habe ich die Extraktion auch mittelst Salmiaklösung ausgeführt, da die bessere Extrahierbarkeit durch diese von früheren Autoren angegeben ist, und ich das Extraktionsmaximum finden wollte.

Wie in der Tabelle I angegeben, extrahierte die 15% Salmiaklösung weit besser als meine Ringer-Lösung. Doch waren die Eiweisskörper darin schon meistens modifiziert worden, wie man weiter unten sehen wird. Die Ringer-Lösung ist also das beste indifferente Extraktionsmittel. Ihr folgt 0.6% Kochsalzlösung, welche Fürth schon damals aus demselben Grund vorwiegend brauchte. Destilliertes Wasser ist etwas weniger extrahierend.

Dass der mittelst der Ringer-Lösung erzielte Extraktionsgrad bezüglich des Stromagehalt am natürlichsten ist, kann man auch nach dem Untersuchungsergebnis von Wladimiroff bejahen, wonach das Stroma mit Myostromin (durch schwaches Alkali extrahierbares Nukleoproteid) ungefähr die Hälfte des gesamten Muskeleiweisses darstellt.

TABELLE I.

Extrahierbarkeit des Muskelplasmas durch verschiedene Extraktionsmittel.
(Prozentsatz von extrahierter Substanz gegen gesamte
Trockensubstanz angegeben.)

Extraktions- mittel	Ringer- Lösung	15% Salmiak- lösung	0,6% Kochsalz- lösung	Destilliertes Wasser
Einzelfälle	50.59 %	67.08 %	53.41 %	39.11 %
	59.67 „	73.00 „		47.09 „
	43.14 „	87.73 „		
	42.94 „	75.77 „		
	48.82 „	76.90 „		
	46.97 „	76.36 „		
	50.46 „	84.57 „		
		71.47 „		
		68.30 „		
Durchschnitt	48.93 %	76.02 %	53.41 %	43.10 %

III. EIGENSCHAFTEN DER GEWONNENEN EXTRAKTE.

Ich habe alle gewonnenen Extrakte auf Aussehen, Reaktion, spontane Fällung, Salzfällung, Dialysefällung, Eiweissgehalt und -arten im Dialysat, Hitzegerinnung und sonstige Eigenschaften geprüft und konnte im grossen und ganzen die Angaben der bisherigen Autoren und auch die von Fürth bestätigen. Aber in einigen Einzelheiten bemerkte ich Abweichungen von den Fürth'schen Angaben, bei denen es sich gerade um das Wesen der Sache handelt:

Erstens ergibt die fraktionierte Hitzegerinnung keineswegs immer ein konstantes Resultat: Die Gerinnungstemperatur variiert je nach der Eiweisskonzentration, der Reaktion, der Salzkonzentration der Extrakte einerseits und der Geschwindigkeit der Erhitzung anderseits.

Fürth nannte die Eiweissfraktion, welche bei 40°C binnen 5 Minuten ausscheidet, das lösliche Myogenfibrin, die bei 50°C

binnen 5 Minuten ausscheidende das Myosin, und die bei 70°C in kurzer Zeit ausscheidende das Myogen, und trennte davon die darüber bis 100°C ausscheidende Fraktion als Serumalbumin.

Diese Trennungsweise war massgebend für die Fürthsche Einteilung, doch ist sie, wie oben erwähnt, nie unveränderlich.

IV. BEDINGUNGEN BEI DER HITZEGERINNUNG.

A. Eiweisskonzentration und Geschwindigkeit der Erhitzung.

Ich habe bei meinen Versuchen folgende Tatsache festgestellt: Je konzentrierter der Eiweissgehalt des Plasmaextraktes ist, desto momentaner und deutlicher tritt die Gerinnung auf, sodass man mit sehr verdünnter Eiweisslösung auch bei gleich schnell fortschreitender Erhitzung eine etwas höhere Gerinnungstemperatur gewinnt, als mit konzentrierter. Andererseits muss man bei konzentrierter Eiweisslösung längere Zeit auf eine bestimmte Temperatur erhitzen als bei weniger konzentrierter, um die bei dieser Temperatur gerinnende Fraktion gänzlich ausfallen zu lassen.

So habe ich erfahren, dass eine 5 Minuten lange Erhitzung auf eine bestimmte Temperatur nicht immer ausreicht, die bezügliche Fraktion total gerinnen zu lassen, weil das Filtrat, weiter auf dieser Temperatur gehalten, sich wieder trübt und nach einer Weile nochmals flockig ausscheidet. Aber andererseits läuft man bei längerer Erhitzung die Gefahr, dass man dadurch die Vermengung der nächsten Fraktion mit der gewünschten befördert.

So habe ich bei der Bestimmung der Gerinnungstemperatur folgendermassen verfahren: Wenn eine Probe auf einer Temperatur etwa 10 Minuten lang unverändert klar blieb, dann hielt ich sie frei von dieser Fraktion, aber wenn sie binnen dieser Zeitdauer opaleszierte oder sich trübte, dann wartete ich, bis die Stärke der Trübung nicht mehr fortschritt und etwaiges Gerinnsel, mit der klaren Überschiebt darauf, nach unten niedersank. Dazu brauchte ich manchmal 20–30 Minuten, sogar ab und zu 1 Stunde lang.

Bei einer vergleichenden Untersuchung erhitzte man alle Proben gleich lang auf jeder Temperatur, bis eine Probe das in derselben Temperatur auszuschcheidende Eiweiss vollständig abschied.

B. Salzkonzentration.

Wie schon Fürth bemerkte, hat der vermehrte Salzgehalt eine die Gerinnungstemperatur erniedrigende Wirkung. Auch ich konnte bei einigen Versuchen die Vermehrung einer Fraktion durch erhöhte Salzkonzentration bei konstant bleibender Reaktion konstatieren. So kann man den grössten Teil des Plasmaeiweisses durch Salzzusatz schon bei 40°C gerinnen lassen.

Hierdurch scheint auch erklärt zu werden, dass der mit 15% Salmiaklösung hergestellte Plasmaextrakt meistens bei 40°C gerinnt und sogar nach einiger Zeit fast total auszufallen pflegt.

C. Reaktionsänderung.

Die von mir mit Ringer-Lösung gewonnenen Plasmaextrakte zeigten die Reaktion zwischen P_H 6.0 und 6.9, meistens P_H 6.3–6.5. Die fraktionierte Hitzegerinnung dieser Extrakte bei der oben beschriebenen Erhitzungsweise zeigte durchschnittlich die folgenden Zahlen:

Lösliches Myogenfibrin (40°C)	2.20–12.14%
Myosin (50°C)	25.43–40.97%
Myogen (70°C)	51.33–62.43%
..... (100°C)	0 %

Die ziemlich grosse Variationsbreite des Wertes aller Fraktionen hängt hauptsächlich von der zwischen der Bereitung und der Untersuchung des Extraktes verlaufenen Zeitdauer ab, sodass nach einigen Tagen sich nicht nur der Gehalt an löslichem Myogenfibrin erhöht, sondern auch eine deutliche Menge der spontanen Fällung bemerkbar wird.

Nicht weniger stark als das Veraltern des Extraktes ist die Reaktion des letzteren bei dem Resultat der Hitzegerinnung beteiligt.

Im allgemeinen wirkt die Vermehrung der H^+ -Konzentration die Gerinnung befördernd, ihre Verminderung dagegen sie verzögernd.

Ich habe bei vielen Versuchen dies Verhältnis untersucht, nachdem ich die Reaktion desselben Extraktes durch Zusatz von N/10 Salzsäure, Ammoniakwasser (spez. Gew.=0.96 bei 15°C) oder von M/15 Phosphatgemisch von verschiedenen P_H mehrfach verändert hatte.

Ein Beispiel ist in der Tabelle II angegeben:

TABELLE II.
Verschiebung der Fraktionsmengen des Ringer-Extraktes durch
 H^+ -Konzentration.
(zu 50 cem von Extrakt wurden je 10 cem des M/15 Phosphatgemischs von
verschiedenen P_H zugesetzt und gleich lang bei jeder Temperatur
gleichzeitig erhitzt.)

Temperatur Extrakte	40°C	50°C	70°C	Summe(g)
Kontrolle				
Phosphatgem. (P_H 6.3) 10 cem zugesetzt	Trübung	mässige Flocken	mässige Flocken	
P_H 6.3	0.026 g	0.052 g	0.056 g	0.134 g
Phosphatgem. (P_H 5.2) 10 cem zugesetzt	geringe Flocken	reichliche Flocken	geringe Flocken	
P_H 5.5	0.032 g	0.064 g	0.037 g	0.133 g
Phosphatgem. (P_H 8.1) 10 cem zugesetzt	spärlich opaleszent	mässige Flocken	reichliche Flocken	
P_H 7.2	unmessbar	0.053 g	0.079 g	0.132 g

Dies Verhältnis ist natürlich nur in einer bestimmten P_H -Breite gültig, da der Eiweisskörper des Extraktes bei der deutlich sauren oder alkalischen Reaktion peptisiert wird und selbst bei Siedehitze ungerinnbar bleibt.

V. EIGENSCHAFTEN DES LÖSLICHEN MYOGENFIBRINS.

Aus den vorangehenden Tatsachen kann man wohl vermuten, dass der Unterschied der verschiedenen Fraktionen des Plasma-eiweisses nur ein durch oben genannte Bedingungen erzeugtes Scheinwissen sei, und dass es sich im Wesen um ein und denselben Eiweisstoff handle. So habe ich zuerst die Eigenschaften des löslichen Myogenfibrins von diesem Standpunkt aus geprüft.

Nach meinen Versuchen fällt das Eiweiss aus dem mit 15% Salmiaklösung hergestellten Extrakte bei 40°C nach 3 Stunden ganz total aus, und das Filtrat ergibt keine Eiweisreaktion mehr. Es fällt auch durch Dialyse gegen Wasser fast gänzlich aus, und das abfiltrierte Dialysat enthält ebenfalls kein Eiweiss mehr.

Auf der anderen Seite fällt der Ringer-Extrakt, welcher wie schon beschrieben viel Myosin und Myogen enthält, durch Zusatz von Salmiak bis zu 15% bei 40°C nach 3 Stunden das Eiweiss auch gänzlich aus, wie es beim Salmiakextrakt der Fall war. Dies Phänomen erklärte Fürth dadurch, dass das Myogen bei der Anwesenheit von Salz, besonders bei höheren Temperaturen, sich sehr leicht ins lösliche Myogenfibrin umwandelt, und dass diese von Salzionen bedingte Wirkung beim Salmiak besonders ausgeprägt ist. Meiner Ansicht nach scheint dies doch durch die vermehrte Salzkonzentration und die Reaktionsveränderung allein erklärt werden zu können. Überdies bezieht es sich nicht nur auf das Myogen, sondern auch das Myosin unterliegt gleichmässig demselben Schicksal. Das kann man aus folgendem Versuch leicht konstatieren: Wenn man den Muskelbrei mit 15% Salmiaklösung extrahiert, deren Reaktion vorher durch Ammoniakzusatz bei PH 7.2 reguliert worden ist, dann ist das Eiweiss aus diesem Extrakt nicht mehr bei 40°C nach 3 Stunden gänzlich fällbar, sondern der Extrakt hält noch eine mässige Menge von Myosin und Myogen zurück. Auf der anderen Seite wird auch aus dem gewöhnlichen Salmiakextrakt durch Alkalizusatz das Eiweiss nicht mehr so leicht ausfällbar; und mit dem Grad der Verminderung der Azidität

proportionell geht die Fällbarkeit zurück. Wenn man ihn bis $\text{pH } 7.2$ neutralisiert, so ist das Eiweiss nicht mehr bei 40°C fällbar, und der Extrakt scheidet erst bei weiterer Erhitzung eine geringe Menge von Myosin und eine grosse Menge von Myogen aus.

Der unbehandelte Salmiakextrakt wird auch bei der Dialyse gegen Wasser nur wenig gefällt, wenn man ihn vorher mehrmals gegen Ringer-Lösung ($\text{pH } 7.2$) dialysiert, und erhält noch reichliches Myogen mit geringem Myosin zurück.

Aus dieser Tatsache kann man wohl schliessen, dass das lösliche Myogenfibrin nur als eine Modifikation zu betrachten ist, welche durch vermehrte Salz- und H^+ -Konzentration verursacht und bei verminderter H^+ -Konzentration wieder in der ursprünglichen Eiweisskörper zurückgebracht werden kann.

VI. KONTINUIERLICHE UMWANDELUNG DES MYOGENS IN MYOSIN UND DES LETZTEREN IN LÖSLICHES MYOGENFIBRIN.

Wenn man den Ringer-Extrakt, welcher von der bei 50°C fällbaren Fraktion befreit ist und nur Myogen enthält, unter Toluolzusatz bei Zimmertemperatur aufbewahrt, so entsteht daraus zuerst nur das Myosin. Erst nach einigen Tagen lässt sich die Entstehung des löslichen Myogenfibrins nachweisen. Ein Beispiel der betreffenden Versuche ist in der folgenden Tabelle III angegeben.

Da man aus weiter unten zu erwähnendem Grunde eine reine Myosinlösung nicht herstellen kann, ist es zwar schwer die Entstehung des löslichen Myogenfibrins aus Myosin allein zu beweisen, doch scheint es wohl natürlich zu schliessen, dass das lösliche Myogenfibrin nur aus Myosin und das Myosin aus Myogen entsteht, weil das lösliche Myogenfibrin stets nach dem Auftritt des Myosins entsteht, und weil man während des weiteren Verlaufes die Vermehrung des löslichen Myogenfibrins auf Kosten des Myosins konstatieren kann, wie es die folgende Tabelle IV zeigt.

Diese Umwandlung erfolgt im Eisschrank sehr langsam und

TABELLE III.

Kontinuierliche Umwandlung des Myogens in andere Eiweisskörper bei Aufbewahrung.

(je 100 cem Myogenlösung unter Toluolzusatz im Zimmer (15°C) aufbewahrt und nach einer bestimmten Zeit auf jede Fraktion geprüft.)

Zeit Temperatur	nach 5 Tagen		nach 14 Tagen	
	(g)	(%)	(g)	(%)
40°C	0	0	0.014	9.27
50°C	0.045	30.20	0.050	33.11
70°C	0.104	69.80	0.087	57.62
Gesamt	0.149	100.00	0.151	100.00

TABELLE IV.

Vermehrung des löslichen Myogenfibrins auf Kosten des Myosins.
(Zimmertemperatur)

(je 100 cem von Myogenlösung wie in Tabelle III in gleicher Weise nach bestimmter Zeit geprüft.)

Zeit Fraktion	nach 9 Tagen		nach 13 Tagen	
	(g)	(%)	(g)	(%)
Bei 40°C gerinnende Fraktion	0.017	8.37	0.041	20.00
Bei 50°C gerinnende Fraktion	0.095	46.80	0.081	39.51
Bei 70°C gerinnende Fraktion	0.091	44.83	0.083	40.49
Gesamt	0.203	100.00	0.205	100.00

verläuft mit der Steigerung der Temperatur immer schneller. Sie wird durch die Steigerung der H^+ -Konzentration einengermassen und durch die Vermehrung der Salzkonzentration sehr auffallend befördert. Die kombinierte Wirkung der beiden letzteren Faktoren ist am stärksten, sodass unter dieser Bedingung die Myogenlösung schon bei Zimmertemperatur momentan der Fällung unterliegt.

Diese kontinuierliche Umwandlung bemerkte auch Fürth in seinem Versuch, indem er beobachtete, dass die Myogenlösung auf Zusatz von 5% KCl erst bei 50°C die Gerinnungsfähigkeit erworben hatte und nach einem weiteren Tag grösstenteils bei 40°C geronnen war. Doch hat er diese Tatsache nur einfach dahin gedeutet, dass das lösliche Myogenfibrin direkt aus dem Myogen, nicht aber aus dem Myosin entsteht.

VII. EIGENSCHAFTEN DES REINEN MYOGENS.

Aus den oben angegebenen Ergebnissen steht es als höchst wahrscheinlich fest, dass das Myogen unter dem Einfluss von Temperatur, Salzgehalt und H^+ -Konzentration sich zuerst zu Myosin, und dann das letztere sich unter denselben Bedingungen zum löslichen Myogenfibrin umwandelt. Demzufolge ergibt sich die Frage, was für Eigenschaften denn das Myogen in reinem Zustande besitze.

So habe ich folgende Versuche ausgeführt: Der Ringer-Extrakt des Muskels wurde anfangs 24 Stunden lang unter fließendem Leitungswasser, dann 5 Tage lang gegen destilliertes Wasser, welches jeden Tag gewechselt wurde, und weiter 2 Tage lang gegen redestilliertes Wasser, das jeden halben Tag gewechselt wurde, dialysiert. Dann filtrierte man das Dialysat vom ausgefallenen Gerinnsel unter salzfreier Manipulation ab. Dieses Filtrat war ganz wasserklar, gab keine Cl^- -Reaktion und nur eine ganz leichte Andeutung von Nessler'scher Reaktion. Seine H^+ -Konzentration war pH 6.3, welche mit dem von Weber auf physiko-chemischem Wege bestimmten isoelektrischen Punkt des Myogens ganz übereinstimmt. Es blieb auch bei Siedehitze ganz klar, gab

keine Fällung durch Zusatz von absolutem Alkohol auch in grosser Menge und trübte sich auch nicht durch Säurezusatz. Nur bei der Anwesenheit von Salzen wurde es durch Hitze oder Alkohol, bei konzentrierter Salzmenge auch sogar spontan fällbar.

Nämlich, wenn man zu je 10 ccm des Filtrats gesättigte Ammonsulfatlösung, deren Reaktion durch Ammoniakzusatz bei pH 6.3 reguliert worden war, in steigender Menge zusetzte, so begann schon bei 16% Sättigung die erste Trübung, und bei 50% Sättigung wurde eine deutliche Ausflockung bemerkbar, die bei totaler Sättigung vollkommen ausfiel.

Auch wenn man dem Filtrat die Ringer-Lösung, deren Reaktion ebenfalls durch Phosphatgemisch bei pH 6.3 gepuffert worden war, in verschiedener Konzentration zusetzte, so wurde es je nach der Salzkonzentration bei Erhitzung verschieden leicht fällbar, obwohl die Kontrolle auch bei Siedehitze ganz klar geblieben war. Tabelle V zeigt ein Beispiel von solche Versuchen.

Wie man aus der Tabelle sieht, wird die Gerinnungstemperatur allmählich mit der Konzentration des vorhandenen Salzes niedriger, und zwar so, dass sich bei geringer Salzkonzentration zuerst nur die Myogen und Myosin entsprechende Gerinnungstemperatur zeigt, die sich aber bei grösserer Konzentration endlich auch der des löslichen Myogenfibrins nähert. Weiter ist es sehr bemerkenswert, dass gerade bei der Lösung, welche die Salze in der Konzentration der gewöhnlichen Ringer-Lösung enthielt, die auf jeder Temperatur gewonnene Fraktion fast dasselbe Mengenverhältnis wie bei der Fraktionierung des Ringer-Extraktes zeigte, wie die Tabelle VI es zeigt.

Aus diesem Ergebnis kann man schliessen, dass das Plasma-eiweiss (das sogenannte Myogen) eigentlich Albuminnatur hat und bei der Anwesenheit von Salz unter verschiedener H^+ -Konzentration verschiedene Scheincharaktere darbietet, welche man als Myogen, Myosin und lösliches Myogenfibrin bezeichnet.

TABELLE V.

Auftreten von allen Fraktionen aus reinem Myogen durch Salzanwesenheit. (zu je 10 ccm von Myogen wurden 2 ccm der verschieden konzentrierten Ringer-Lösung von PH 6.3 zugefügt und gleichzeitig auf die ausfallende Fraktion geprüft. Hier ist die Salzkonzentration der gewöhnlichen Ringer-Lösung als 1 bezeichnet. Alle Proben haben die Reaktion von PH 6.3)

Salzkonzentration Temperatur	Kontrolle (salzfrei)	1/200	1/20	1/4	I
Zimmertemperatur	klar	klar	klar	klar	klar
40°C	klar	klar	ganz spärlich. opaleszent	spärlich. opaleszent	opaleszent
50°C	klar	spärlich. opalesz.	leichte Trübung	Trübung	Trübung
70°C	klar	filtrierbare Trüb.	Flockung	Flockung	Flockung
100°C	klar	wie oben filtrierbare Trüb.	opalesz.	klar	klar

TABELLE VI.

Vergleich der Hitzefraktionierung der mit Ringer-Salz versetzten reinen Myogenlösung mit der des gewöhnlichen Ringer-Extraktes. (zu 80 ccm reinem Myogen wurden 20 ccm von 5 fach konzentrierter Ringer-Lösung von PH 6.3 zugesetzt und auf ihre Fraktion geprüft.)

Temperatur	Probe (100 ccm)		Gewönl. Ringer-Extrakt (Grenzwerte der Variation)
	(g)	(%)	
40°C	0.011	14.10	2.20–12.14%
50°C	0.026	33.33	25.43–40.97%
70°C	0.041	52.57	51.33–62.43%

VIII. PRÜFUNG GEGEN DIE SELBSTÄNDIGKEIT DES MYOSINS.

Wenn das Myosin ganz unabhängig von Myogen und seinem Derivat "dem löslichen Myogenfibrin" da ist, wie Fürth angenommen hatte, so sollte es gewissermassen selbständige Eigenschaften haben, welche Fürth auch konstatiert zu haben glaubte. Nach meinen eigenen Versuchen ist dies leider sehr unwahrscheinlich geworden: Ich versuchte nämlich durch Salzfällung mit Ammonsulfat das Myosin rein zu isolieren, aber die Versuche waren immer vergeblich. Dem von löslichem Myogenfibrin befreiten Ringer-Extrakt fügte ich gesättigte Ammonsulfatlösung im Verhältnis von 2:1.5 zu, filtrierte den Niederschlag durch ein Seidentuch über eine Nutsche, löste ihn wieder in Ringer-Lösung und fällte abermals mit Ammonsulfat. Solche Reinigung wurde 2 bis 5 mal wiederholt, und endlich der Niederschlag mit gleich stark gesättigter Ammonsulfatlösung einige Male durchgewaschen und in einer bestimmten Menge der Ringer-Lösung gelöst; dann wurde das Ammonsalz durch Dialyse gegen Ringer-Lösung beseitigt.

Das vom Dialysegerinnsel abfiltrierte Dialysat wurde auf Myosin durch seine Koagulationstemperatur geprüft. Diese konnte man aber nie bestimmt finden, d. h. man fand ausser der meistens bei 50°C ausfällbaren, dem Myosin entsprechenden Fraktion noch immer eine geringe Menge des bei 40°C und 70°C ausfällbaren, dem löslichen Myogenfibrin resp. dem Myogen entsprechenden Eiweisses beigemischt. Diese Verhältnisse wurden auch bei 5 mal sehr vorsichtig wiederholt gereinigtem Präparat gefunden.

So habe ich weiterhin auf die Dialyse verzichtet und verfuhr ganz wie Fürth, indem ich den wiederholt gefällten und gewaschenen Niederschlag nach einfachem Abtupfen mit Filterpapier sofort in Ringer-Lösung löste. Die so erhaltene Lösung enthielt dann fast das Myosin allein, abgesehen von einer Spur vom bei 40°C opaleszierenden Fraktionsteil. Also kann man sie fast als reines Myosin anerkennen. Wenn man dabei 0.6% Kochsalzlösung statt Ringer-Lösung anwendet, wie gerade Fürth es getan hat,

so kann man die Isolierung des Myosins weiter günstig beeinflussen. Das Verhalten dieser Myosinlösung bei Erhitzung ist unter „Kontrolle“ in der Tabelle VII angegeben. Doch darf man dabei die folgende Tatsache nicht übersehen, nämlich dass die Reaktion der durch obiges Verfahren dargestellten ammonsalzhaltigen Myosinlösung immer saurer (P_H 5.8–6.3) war, als die der durch Dialyse gegen Ringer-Lösung ammonsalzfrei gemachten Lösung, deren Reaktion immer weniger sauer (P_H 6.9–7.0) geblieben war.

Man darf also annehmen, dass das Myosin unter ganz beschränkten Bedingungen eine scheinbare Selbständigkeit besitzt.

IX. UMKEHRBARKEIT DER DREI BESTANDTEILE.

Da in den vorstehenden Versuchen das Mengenverhältnis der 3 Fraktionen im Plasmaextrakt durch die Veränderung der Salz- oder H^+ -Konzentration verschiedentlich verändert werden konnte, so ist es sehr natürlich zu denken, dass die 3 Fraktionen untereinander gewissermassen umkehrbar seien. Um dies sicher zu konstatieren, habe ich mit der oben genannten fast reinen Myosinlösung folgenden Versuch gemacht. Ich änderte nur die Reaktion der Myosinlösung, indem ich zu einer bestimmten Menge davon eine je gleiche Menge M/15 Phosphatmischung von verschiedenen P_H zusetzte, und das Verhalten der Lösungen gegen die Hitze-gerinnung prüfte. Ein Beispiel ist in der Tabelle VII angegeben.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, vermehrt sich bei P_H 5.2 die bei 40°C fällbare Fraktion ein wenig, während bei P_H 7.2 die bei 70°C fällbare Fraktion sehr deutlich neu entstanden ist. Das der ursprünglichen Lösung isohydrisch gepufferte Gemisch enthält nur fast das sämtliche ursprüngliche Myosin.

Man kann also durch den Versuch aus dem Myosin je nach der Reaktion der Lösung die beiden anderen Fraktionen entstehen lassen.

Dass aus dem Myogen durch Salzvermehrung oder Reaktionsänderung das Myosin und das lösliche Myogenfibrin entstehen, war schon oben unter Abschnitt 4 und 6 konstatiert. So kann man

TABELLE VII.

Umkehrbarkeit der drei Bestandteile durch Änderung der H^+ -Konzentration der Lösung.

(Fast reines Myosin wurde durch alleinige PH-Änderung bald in lösliches Myogenfibrin, bald in Myogen umgewandelt. Zu 50 cem der Myosin-lösung in 0.6% Kochsalzlösung je 2 cem des Phosphatgemisches von verschiedenen PH zugesetzt.)

Temperatur Probe	40°C	50°C	70°C	Summe
Kontrolle Phosphatgem. (PH 5.8) zugesetzt PH 5.8	spärl. opalesz. 0.002 g	Flockung 0.016 g	klar 0 g	0.018 g
Phosphatgem. (PH 5.2) zugeesetzt PH 5.2	Trübung 0.007 g	Flockung 0.012 g	klar 0 g	0.019 g
Phosphatgem. (PH 8.1) zugeesetzt PH 7.2	klar 0 g	opaleszent 0.005 g	Flockung 0.013 g	0.018 g

sagen, dass das Myogen unter dem Einfluss von Salz- und H^+ -Konzentration zwei andere Bestandteile abgibt, und dass die beiden letzteren bei bestimmter H^+ -Konzentration gewissermassen wieder zum Myogen umkehrbar sind.

SCHLUSSFOLGERUNG.

Aus den oben ausgeführten Ergebnissen kann man folgendes schliessen: Obwohl man im Plasmaextrakte vom quergestreiften Muskel die drei Bestandteile, wie sie Fürth angab, und kein anderes Eiweiss mehr nachweisen kann, ist doch ihre Begrenzung durch fraktionierte Hitzeerinnung oder Salzfallung mit Ammonsulfat sehr willkürlich und inkonstant zu nennen, weil sie von der

jeyeiligen H^+ - und Salzkonzentration einerseits und der Dauer der Temperatureinwirkung anderseits sehr abhängig ist. Besonders ist die Annahme von Fürth, dass das Myosin und das Myogen von ganz anderer Abstammung seien, und dass das lösliche Myogenfibrin nur direkt aus den Myogen, nicht aber aus dem Myosin entstehe, ganz unwahrscheinlich.

Nach meinen Versuchsergebnissen wandelt sich das Myogen, welches von Albuminnatur ist, unter dem Einfluss von Salz- und H^+ -Konzentration zuerst in Myosin um, und das letztere weiter je nach den Bedingungen in lösliches Myogenfibrin, welches endlich spontan zu gerinnen scheint. Überdies kann man zwischen diesen drei Bestandteilen eine gewisse gegenseitige Umkehrbarkeit konstatieren.

Also darf man wohl die drei Bestandteile nur als Umwandlungsphasen eines einzigen Eiweisskörpers betrachten, die je nach den Bedingungen gewissermassen umkehrbar sind.

Aber die Frage, welcher physiko-chemische Vorgang dabei stattfindet, und was für eine Beziehung zwischen dem Plasmaeiweiss und dem Stromaeiweiss vorhanden ist, bleibt vorerst ganz offen.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. S. Kakiuchi für seine unermüdliche und freundliche Leitung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Danilewsky, A. (1882): Z. f. physiol. Chem., 7, 124.
 Fürth, O. (1895): Archiv f. exp. Pathol. u. Pharm., 36, 231.
 Halliburton, W. (1887): Journ. of Physiol., 8, 133.
 Kühne, W. (1859): Archiv f. Anat. u. Physiol.,
 Weber, H. (1925): Biochem. Z., 158, 443.
 „ „ (1925): „ „ 158, 473.
 „ „ (1927): „ „ 189, 405.
 Wladimiroff, G. (1926): Biochem. Z., 167, 156.

STUDIES IN EXPERIMENTAL SCURVY.

XI. Glutathione Content of Organ Tissues of Guinea Pigs Fed on Vitamin C Free Diet.

By

RYOJI SATO AND SHINSUKE OHATA.

(From the Laboratory of Biological Chemistry, Tokyo Jikei-Kwai Medical College, Tokyo. Director: Prof. T. Nagayama.)

(Received for publication, May 23, 1931)

Since a new significance was bestowed on the phases of tissue oxidation by G. Hopkins' discovery (1921) of glutathione, manifold investigations upon this substance have appeared. Yet it seems to us that none of them reports on the relationship between tissue glutathione content and scurvy. For the reason, we have determined the glutathione content of various organ tissues of the scorbutic guinea pigs and have attained the following results.

I. METHODS OF EXPERIMENTS.

For the present experiment, a number of guinea pigs weighing from 365 to 530 gm. are employed. These animals, put separately into metabolic cages, are reared with Sherman's vitamin C free diet as base. To the control and scorbutic animals, fresh or boiled radish juice is given respectively. At the end of the scorbutic period, guinea pigs in both control and scorbutic groups are slaughtered for the determination of glutathione content in each organ tissue by means of Perzweig-Delrue's modification of Tanniccliffe's method (1927).

II. REDUCED GLUTATHIONE CONTENT IN THE CASE OF NORMAL GUINEA PIGS.

As is observed in the following table, it is the liver that shows

TABLE I. Reduced Glutathione Content in Organs of Normal Guinea Pigs.

[illegible]

the largest glutathione content, and the least is indicated by muscle. The content in other organs lies between the two.

III. REDUCED GLUTATHIONE CONTENT IN THE CASE OF GUINEA PIGS FED ON VITAMIN C FREE DIET.

The determination of glutathione content in organ tissues of scorbutic animals gave results, as summarised in Table II.

In this case also there have been almost the same results as in that of the normal animals. There is a rich amount of glutathione in the liver, but little in the muscle. On comparison of these contents with those in normal animals, a significant increase can be seen just in suprarenals but not much difference in any other organ. Yet in muscle of scorbutic animals, the glutathione content seemingly increases to some degree. For, convenience in comparing the glutathione content in the organ tissues of both control and scorbutic animals, in Table III, there have been given the percentages of the contents and the ratio of decrease or increase.

In the present experiment, as the scorbutic animals also maintained a pretty good appetite till the end of the scorbutic period, we have not specially performed an experiment with animals that have fasted.

IV. CONCLUSIONS.

1. The percentages of the reduced glutathione contents in the various organ tissues of normal guinea pigs are as follows: Liver: 0.2402; suprarenals: 0.0753; kidneys: 0.1264; lungs: 0.0853; heart: 0.0552; spleen: 1298; testicles: 0.1376, and muscles: 0.0248.

2. The percentage of the glutathione content in guinea pigs in experimental scurvy, shows a tolerable increase in suprarenals, and a tendency of increase in muscle, but hardly any difference from the normal can be seen in the other organs.

TABLE II. Reduced Glutathione Content in Organs of Guinea Pigs in Scurvy.

No. of animal	Date	Body wt.		Liver		Suprarenal		Kidney		Lung		Heart		Spleen		Testicle		Muscle
		Ini.	Fi-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	Wt.	Gluta-	
		g	nal	g	thione	g	thione	g	thione	g	thione	g	thione	g	thione	g	thione	%
4	22/X	440	310	12.0	0.2258	0.35	0.1070	3.75	0.1320	2.60	0.0820	1.00	0.0596	0.75	0.1130	1.60	0.1313	0.0317
11	5/XI	415	290	10.4	0.2935	0.35	0.1018	3.05	0.1200	2.40	0.0882	1.00	0.0508	0.27	0.1134	1.30	0.1467	0.0291
13	14/XI	450	305	10.2	0.2244	0.45	0.1242	2.80	0.1067	2.30	0.0883	1.05	0.0556	0.35	0.1097	1.50	0.1547	0.0348
17	16/XI	420	335	11.5	0.2209	0.45	0.1013	3.70	0.1184	2.65	0.0822	1.05	0.0580	0.72	0.1312	0.60	0.1400	0.0299
15	17/XI	530	345	11.5	0.2379	0.40	0.1050	3.30	0.1291	2.80	0.0817	1.07	0.0566	0.40	0.1324	2.25	0.1509	0.0284
Maximum		530	345	12.0	0.2935	0.45	0.1242	3.75	0.1320	2.80	0.0883	1.07	0.0596	0.75	0.1324	2.25	0.1547	0.0348
Minimum		415	290	10.2	0.2209	0.35	0.1013	2.80	0.1067	2.30	0.0817	1.00	0.0508	0.27	0.1097	0.60	0.1313	0.0284
Average		451	317	11.1	0.2405	0.40	0.1079	3.32	0.1212	2.55	0.0845	1.03	0.0561	0.50	0.1199	1.45	0.1447	0.0308

TABLE III.

	Liver	Supra-renal	Kidney	Lung	Heart	Spleen	Testicle	Muscle
Normal	0.2402	0.0753	0.1264	0.0853	0.0552	0.1298	0.1376	0.0248
Scurvy	0.2405	0.1079	0.1212	0.0845	0.0561	0.1199	0.1447	0.0308
Difference in %	0	+43	-4	-1	+2	-7.6	+5	+24

REFERENCES.

Hopkins, G. (1921): *Biochem. J.*, **15**, 286.

Perzweig, W. A. and Delrue, G. (1927): *Biochem. J.*, **21**, 1416.

Additional writing: We are indebted to Count Mutsu and Baron Takagi for the expenses of this work which have been defrayed from Ujun-Kwai.

ÜBER SCHWERMETALLKATALYSE VON BIOLOGISCHEM INTERESSE.

I. Mitteilung. Der Stärkeabbau durch künstliche Peroxydase.

VON

T. OMORI.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)*

(Eingegangen am 26. Mai 1931)

Nach Biedermann und Jnerkoff (1924) haben künstliche Peroxydase, Hämoglobin und pflanzliche Peroxydase amylytische Wirkung; und weiter fanden sie, dass Sauerstoff bei der "Regeneration" des durch Erhitzen abgeschwächten Speichelferments die wichtigste Rolle spielt. Diese Ergebnisse führten sie zu der Ansicht, dass beide Fermente, Diastase und Oxydase, zueinander in innigen Beziehungen stehen. Sie führen aus: "Mit der Annahme, dass Oxydasen zum System der diastatischen Fermente gehören oder, wie man es vielleicht richtiger ausdrücken würde, dass die diastatisch wirkenden Enzyme zu den Oxydasen zu rechnen sind, wäre nicht nur die erstaunlich weite Verbreitung solcher Fermente erklärt, sondern auch ihre physiologische Bedeutung klargestellt usw."

Mir lag daran diese Frage nachzuprüfen und ausführlicher zu untersuchen. Zuerst wurde die Wirkung künstlicher Peroxydasen, die aus Wasserstoffsuperoxyd und verschiedenen Schwermetallsalzen, z.B. Eisensulfat, Kupfersulfat, Vanadinchlorid, Kobaltsulfat, Nickelsulfat und Manganchlorür bestanden, auf Stärkelösung geprüft. Die Wirkungstemperatur war 40°C, und als Masstab für den Spaltungsgrad wurde die Jodstärke-Reaktion benutzt, mittels welcher alle 3 Minuten herausgenommene kleine Portionen auf einer weissen Porzellanschale geprüft wurden.

Unter diesen Schwermetall- H_2O_2 -Systemen zeigte sich das Eisen am stärksten amylytisch wirksam; danach folgten der Reihe Eisen am stärksten amylytisch wirksam, danach folgten der Reihe nach Kupfer, Vanadium, Nickel und Kobalt und zuletzt Mangan. Wenn diesem System das Wasserstoffsuperoxyd entzogen wurde, dann blieb die Wirkung aus, auch bei Mangan trotz des entgegengesetzten Befundes von Biedermann (l. c.). (Tabelle I.)

TABELLE I.

Stärkeabbau durch Schwermetallsalze	Reaktions-system	(a)=Schwermetallsalz-Lsg. 3 cem + 0,5% Stärke-Lsg. 2 cem + 1 Mol H_2O_2 0,1 cem. (b)=Von (a) H_2O_2 entzogen	
		Jodstärke-Reaktion nach 2 Stunden	Jodstärke-Reaktion nach 4 Stunden
Schwermetallsalze			
M/500 Eisensulfat	(a) (b)	(Nach 7' farblos.) blau	blau
M/100 Kupfersulfat	(a) (b)	rötlich violett blau	farblos blau
M/100 Nickelsulfat	(a) (b)	violett blau	rötlich violett blau
M/100 Kobaltsulfat	(a) (b)	violett blau	rötlich violett blau
M/100 Vanadinchlorid	(a) (b)	rötlich violett blau	farblos blau
M/100 Manganchlorür	(a) (b)	blau blau	violett blau

Eisenchlorid wirkte ebenso stark wie Eisensulfat, aber die komplexen Eisensalze, wie Ferrocyankali und Ferricyankali, zeigten eine weit untergeordnete Wirkung.

Um festzustellen, ob der durch dieses System erreichte achromatische Punkt echte Verzuckerung bedeutet, führte ich den Zucker-

nachweis nach Trommer aus und erhielt ein deutlich positives Resultat.

Um die äusseren Bedingungen konstant zu machen, habe ich die nachfolgenden Versuche bei 40°C und Ph 3,6 vorgenommen, weil die Wirkung dieses Systems bei niederer Temperatur sehr schwach ist und mit steigendem Ph absinkt.

Dass verschiedene Oxybenzole, wie Hydrochinon, Brenzkatechin, P-Kresol, Tyrosin und Adrenalin einen sehr beträchtlich befördernden Einfluss auf die Wirkung des Eisen-H₂O₂-Systems ausübten, selbst wenn sie nur in sehr geringen Mengen zugesetzt wurden, scheint mir ein sehr bemerkenswerter Befund. In der Kontrolle setzte ich Wasserstoffsuperoxyd mit Brenzkatechin an und fand eine schwach amylytische Wirkung, die aber im Vergleich zu dem Falle, in dem Eisen mitexistierte, nur sehr geringfügig war. Bei einer weiteren Kontrollprobe, bei der ich Eisensalz und Brenzkatechin wirken liess, war eine solche Wirkung nicht festzustellen. (Tabelle II.).

TABELLE II.

Reaktionssystem	Zugesetzte Substanzen	Spaltungs- geschwindigkeit
0,5 % Stärkelösung 1 ccm	(Kontrolle ohne Zusatz)	nach 180' farblos
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 ccm	M/20 Tyrosin 0,1 ccm	„ 15' „
M/1000 Ferrisulfat 2 ccm	M/50 Brenzkatechin „	„ 30' „
1 Mol H ₂ O ₂ 0,1 ccm	„ Hydrochinon „	„ 50' „
	„ P-Kresol „	„ 70' „
	M/200 Adrenalin „	„ 130' „
0,5 % Stärkelösung 1 ccm Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 ccm M/1000 Ferrisulfat 2 ccm M/50 Brenzkatechin 0,1 ccm	Kontrolle ohne H ₂ O ₂	nach 7 Stunden blau
0,5 % Stärkelösung 1 ccm Acetatpuffer (Ph 3,9) 2 ccm Aq. dest. 2 ccm 1 Mol H ₂ O ₂ 0,1 ccm M/50 Brenzkatechin 0,1 ccm	Kontrolle ohne Eisen- salz.	nach 7 Stunden röt- lich-violett.

Man könnte einwenden, dass es sich hier um die Wirkung von Bakterien gehandelt habe, doch bin ich bei sterilem Verfahren zu demselben Ergebnis gekommen. Bei dem Ferro- bzw. Ferricyan-kali- H_2O_2 -System, das an sich, wie erwähnt, sehr schwach wirksam ist, war der aktivierende Einfluss der Oxybenzole kaum zu erkennen. (Tabelle III.).

TABELLE III.

Reaktionssystem	Zugesetzte Substanzen	Spaltungs- geschwindigkeit
0,5 % Stärkelösung 1 ccm	(Kontrolle ohne Zusatz)	nach 8 Stunden farblos
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 ccm	M/50 Brenzkatechin 0,4cc	„
M/100 Ferricyankali 2 ccm	„ Hydrochinon „	„
1 Mol H_2O_2 0,1 ccm	„ P-Kresol „	„
0,5 % Stärkelösung 1 ccm	(Kontrolle ohne Zusatz)	nach 5 Stunden rot
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 ccm	M/50 Brenzkatechin 0,4cc	„
M/100 Ferricyankali 2 ccm	„ Hydrochinon „	„
1 Mol H_2O_2 0,1 ccm	„ P-Kresol „	„

Bei dem Kupfer- H_2O_2 -System, dessen amylolytische Kraft der Intensität nach auf die des Eisen- H_2O_2 -Systems folgt, war die Aktivierung der Oxybenzole schwächer als beim Eisen- H_2O_2 -System, aber immerhin doch deutlicher als beim Nickel- H_2O_2 -System. (Tabelle IV).

Worauf ist es nun zurückzuführen, dass die Oxyphenole eine derartig aktivierende Kraft auf das Schwermetall- H_2O_2 -System ausüben?

Diese Frage ist allerdings schwer zu beantworten, und es ist auch noch eine Frage, welches von beiden, das Oxyphenol oder das Schwermetall, bei dem stärkespaltenden Prozess die Hauptrolle spielt. Ich vermute jedoch, dass es sich um eine oxydationskatalytische Wirkung eines Oxyphenols und zwar des Chinons handelt, welches durch das Schwermetall- H_2O_2 -System aus Oxyphenol gebildet wird. Zur Wirksamkeit des Schwermetall- H_2O_2 -Systems

TABELLE IV.

Reaktionssystem	Zugesetzte Substanzen	Spaltungs- geschwindigkeit
0,5 % Stärkelösung 1 cem	(Kontrolle ohne Zusatz)	nach 7 Stunden violett
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 cem	M/50 Hydrochinon 0,1cem	„ farblos
1 Mol H ₂ O ₂ 0,1 cem	„ Brenzkatechin „	„ rot
M/100 Kupfersulfat 2 cem	„ P-Kresol „	„ rötlich-violett
	M/200 Adrenalin „	„ rot
0,5 % Stärkelösung 1 cem	(Kontrolle ohne Zusatz)	„ bläulich-violett
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 cem	M/50 Hydrochinon 0,1cem	„ rötlich-violett
1 Mol H ₂ O ₂ 0,1 cem	„ Brenzkatechin „	„ bläulich-violett
M/100 Nickelsulfat 2 cem	„ P-Kresol „	„ „
	M/200 Adrenalin „	„ rötlich-violett

und des Schwermetall-H₂O₂-Oxyphenol-Systems gibt es bestimmte optimale H₂O₂- und Oxyphenolkonzentrationen. (Tabelle V und VI.). Wenn diese im Reaktionssystem in zu grosser Stärke vorhanden sind, so wirken sie wahrscheinlich als Akzeptor des aktivierten Sauerstoffs und setzen die Wirkung herab.

TABELLE V.

Reaktionssystem	Zugesetzte H ₂ O ₂ -Konzentr.		Spaltungs- geschwindigkeit		
0,5 % Stärkelösung 1 cem	1 Mol H ₂ O ₂	0,5 cem	nach	18'	farblos
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 cem	M/5 „	„	„	5'	„
M/1000 Ferrisulfat 2 cem	M/10 „	„	„	„	„
	M/20 „	„	„	8 Stunden	rot
	M/40 „	„	„	„	„
	M/80 „	„	„	„	„
	M/160 „	„	„	„	„
	M/320 „	„	„	„	„
	(Kontrolle ohne Zusatz)		„	„	„

Trotzdem die bis jetzt erwähnten Versuche eine mehr oder weniger starke amylytische Wirkung nachgewiesen haben, zeigte es sich, dass die Peroxydase aus Meerrettich, die starke Guajakol-

TABELLE VI.

Reaktionssystem	Zugesetzte Hydrochinonkonzentration	Spaltungsgeschwindigkeit
0,5 % Stärkelösung 1 ccm	M/10 Hydrochinon 0,5 ccm	nach 7 Stunden rot
Acetatpuffer (Ph 3,6) 2 ccm	M/50 " "	" 60' farblos
M/1000 Ferrisulfat 2 ccm	M/100 " "	" 5' "
M/10 H ₂ O ₂ 0,5 ccm	M/200 " "	" 15' "
	M/400 " "	" 60' "
	M/800 " "	" 120' "
	M/1000 " "	" 150' "
	(Kontrolle ohne Zusatz)	" 330' "

reaktion zeigte, und Tyrosinase aus Kartoffeln auf Stärke ohne alle Wirkung blieben, und das selbst bei gleichzeitigem Vorhandensein von H₂O₂ und Oxyphenol.

Diese Tatsache entspricht meiner Voraussetzung ebensowenig wie den Biedermann'schen Befunden, nach denen auch pflanzliche Peroxydase amylytisch wirken kann. Wie ist dieser Unterschied zu erklären?

Wenn die Diastase zum System der oxydativen Fermente gehört, so müsste die Diastasewirkung im Vakuum mehr oder weniger vermindert werden; bei meinen Versuchen mit Speichel und Takadiastase habe ich aber keinerlei Einfluss feststellen können, selbst wenn der Versuch im Vakuum ausgeführt wurde.

TABELLE VII.

Versuchsbedingungen	Jodstärke-Reaktion nach 4 Stunden.
1 % Stärkelösung 2 ccm (kurz vorher aufgekocht) + Speichelfermentlösung nach Biedermann (bis zum beginnenden Sieden erhitzt) 2 ccm bei 45°C.	blau
1 % Stärkelösung 2 ccm (abgekühlt und an der Luft stark geschüttelt) + Speichelfermentlösung (wie oben behandelt, darauf abgekühlt und an der Luft stark geschüttelt) 2 ccm bei 45°C.	rötlich-violett

Weiter war auch die Regeneration des durch Erhitzen geschwächten Speichelferments durch Schütteln an der Luft nicht so bedeutend, dass ich ohne weiteres mit Biedermann annehmen könnte, dass Sauerstoff bei der Diastasewirkung "die wichtigste Rolle" spielt.

Aus meinen Versuchen schliesse ich, dass Stärke zwar durch ein Schwermetall- H_2O_2 -System oder noch stärker durch Zusatz von Oxyphenol zu demselben gespalten werden kann; aber der Wirkungsmechanismus ist doch ein ganz anderer als der der Diastase.

Am Schlusse dieser Arbeit sei es mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. K. Kodama, für gütige Anregung und Leitung bei dieser Arbeit meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Biedermann, W.: Biochem. Zeitschr., **129**, 582.
Biedermann, W.: Biochem. Zeitschr., **135**, 212.
Biedermann, W.: Biochem. Zeitschr., **137**, 35.
Biedermann, W. u. Jenerkoff, C.: Biochem. Zeitschr., **149**, 309.
Biedermann, W. u. Jenerkoff, C.: Biochem. Zeitschr., **150**, 477.
Goldhammer, H.: Biochem. Zeitschr., **189**, 181.

ÜBER DEN EINFLUSS DER CHLORIONEN AUF DIE SPEICHELAMYLASE.

VON

T. OMORI.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)*

(Eingegangen am 26. Mai 1931)

Die Tatsache, dass die Amylase frei von Neutralsalzen ihre Wirkung nicht entfalten kann, ist bereits von vielen Forschern (Bierry 1906 u. 1907, Preti 1907, Slosse 1908, Kendall und Schermann 1919, Starkenstein 1912, Norris 1913 und Brunacci 1927) festgestellt und wiederholt bestätigt worden. Andererseits hat Wohlgemuth 1906 festgestellt, dass Kochsalz auf die Amylase-Wirkung einen ganz gewaltig befördernden Einfluss ausübe.

Nach Bierry und Wohlgemuth ist diese aktivierende Wirkung des Neutralsalzes dem Anion zuzuschreiben. Michaelis (1914) bestätigte, dass die Neutralsalze verschiedene Affinität zu den Fermenten haben, und zwar das Nitrat die stärkste und danach das Chlorid. Es ist aber bemerkenswert, dass die Aktivierungskraft der Salze sich gerade umgekehrt verhält. Biedermann fand auch einen definitiven Einfluss von Rhodan und Citrat auf die Fermente, wogegen er Sulfat und Phosphat fast völlig unwirksam fand.

Da es mir fraglich erschien, ob das Neutralsalz wirklich mit der Amylase eine Verbindung eingeht, oder nur als Katalysator wirkt, habe ich es unternommen dieses Problem mit Hilfe physikalischer Methoden aufzuklären.

EIGENE VERSUCHE.

Der zu der Untersuchung verwendete Speichel wurde von der

eigenen Mundhöhle gesammelt und unter Zusatz von Toluol drei Tage lang elektrodialysiert, darauf abfiltriert und aufbewahrt. Der auf diese Weise erhaltene Speichel verliert seine Wirkung fast gänzlich, doch kann die Wirkung durch Zusatz von Kochsalz wieder gehoben werden.

Wir kommen bei diesem Versuche zum Ziele, wenn es uns gelingt in dem Medium salzfreier Speichel plus Chloridlösung die Abnahme der Cl-Ionen-Konzentration bestätigen zu können. Zu diesem Zwecke habe ich die Cl-Ionen-Bestimmung nach der potentiometrischen Methode von R. S. Aitken(1928) durchgeführt, deren Prinzip in der nachstehenden Konzentrationskette besteht:

Ag. AgCl | 0,02 m KCl | unbekannte Chloridlösung | AgCl. Ag
Dazu die Gleichung:

$$E = \frac{2\eta RT}{nF} \cdot \ln \frac{C_1 \gamma_1}{C_2 \gamma_2}$$

in welcher bedeutet:

E=E.M.F. η =Transferenznummer, R=Gaskonstanz,

T=Absolute Temperatur, n=Valenz, F=Faraday'sche Kon-
stanz,

C_1, C_2 =Konzentration der Lösung, γ_1, γ_2 =Aktivitätskoeffizient d.
Anion.

Mit Hilfe dieser Formel ist die Cl'-Konzentration zu berechnen, angenommen dass γ_1 und γ_2 bei so grosser Verdünnung der Salze gleich eins sind. Wegen der Lichtempfindlichkeit der Silberchloridelektrode muss der ganze Versuch im Dunkeln vorgenommen werden. Das Versuchsgefäss wurde im Thermostaten bei 20°C gehalten.

Die gebundene Cl'-Zahl wurde praktisch in der folgenden Weise erhalten: Cl'-Konzentration von (Aqua destillata + NaCl-Lösung) + Cl'-Konzentration von (Aqua destillata + Speichel) — Cl'-Konzentration von (NaCl-Lösung + Speichel) = gebundene Cl'-Zahl.

In der Tabelle I kann man sehen, wie bei Zusatz von NaCl-Lösung zu dem Speichel die Cl'-Konzentration vermindert wird.

TABELLE I.

	E. M. F.	Cl-Konzentr. in Mol	Differenz.
Aq. dest. 3 ccm + m/1000 NaCl 3 ccm	0,08805	0,000627	0,000117
Aq. dest. 3 ccm + Speichel 3 ccm	0,15810	0,000039	
Speichel 3 ccm + m/1000 NaCl 3 ccm	0,09140	0,000549	

Die Tabelle II zeigt, dass bei Zusatz von KCl an Stelle von NaCl die Cl'-Bindung in gleicher Weise stattfindet. Dass die Aktivierung um so besser vor sich geht, je grösser die gebundene Cl'-Menge ist, kann durch die Bestimmung des achromatischen Punktes, wie in Tabelle II angegeben, nachgewiesen werden.

TABELLE II.

	E. M. F.	Cl-Konzentr. in Mol	Cl' gebunden	Achromat. Punkt Minuten
0,01 Mol KCl 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0237	0,007812	0,001708	48'
0,01 Mol KCl 5 ccm + Aq. dest. 2 ccm	0,0195	0,009259		
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,1095	0,000261		
0,005 Mol KCl 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0400	0,004106	0,000132	66'
0,005 Mol KCl 5 ccm + Aq. dest. 2 ccm	0,0408	0,003987		
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,1095	0,000261		
0,002 Mol KCl 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0562	0,002155	0,000076	75'
0,002 Mol KCl 5 ccm + Aq. dest. 2 ccm	0,0585	0,001970		
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,1095	0,000261		

Dasselbe Resultat wurde auch in betreff der Leitfähigkeitsverminderung festgestellt. Interessant war bei diesen Versuchen, dass bei den für die Speichelamylase indifferenten Salzen wie z.B. Phosphat und Sulfat keine Verminderung der Leitfähigkeit eintrat; dagegen fand diese bei den mehr oder weniger aktivierenden Salzen wie z.B. Chlorid und Nitrat statt; und wie zu erwarten war fand

ich den Grad dieser Verminderung bei Zusatz von Nitrat geringer, als er bei Chloridzusatz war. (Tabelle III).

TABELLE III.

	Leitfähigkeit	Differenz
Aq. dest. 2 ccm + 0,01m. KCl-Lsg. 5 ccm	0,0009535 Mho.	-0,0001013 Mho.
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0000093 Mho.	
Speichel 2 ccm + 0,01m. KCl-Lsg. 5 ccm	0,0008615 Mho.	
Aq. dest. 2 ccm + 0,01m. NaNO ₃ -Lsg. 5 ccm	0,0008403 Mho.	-0,0000783 Mho.
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0000093 Mho.	
Speichel 2 ccm + 0,01m. NaNO ₃ -Lsg. 5 ccm	0,0007713 Mho.	
Aq. dest. 2 ccm + Phosphatpuffer(0,01m.) 5 ccm	0,0009046 Mho.	+0,0000789 Mho.
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0000093 Mho.	
Speichel 2 ccm + 0,01m. Phosphatpuffer 5 ccm	0,0009928 Mho.	
Aq. dest. 2 ccm + 0,01m. Na ₂ SO ₄ -Lsg. 5 ccm	0,0014228 Mho.	+0,0001104 Mho.
Aq. dest. 5 ccm + Speichel 2 ccm	0,0000093 Mho.	
Speichel 2 ccm + 0,01m. Na ₂ SO ₄ -Lsg. 5 ccm	0,0015425 Mho.	

Durch diese meine Versuchsergebnisse ist die Grundlage, auf welcher die Aktivierung durch Neutralsalz beruht, zweifelsfrei festgestellt worden, nämlich die aktivierenden Salze gehen chemische Verbindungen mit der Amylase ein.

LITERATUR.

- Aitken, R. S.: Biochem. Journ., **22**-II, 1239.
 Bierry, H.: Biochem. Zeitschr., **40**, 357.
 Brunacci, B.: Bull. sc. Med., **80** (Nach Oppenheimer zitiert.)
 Carmody, R.: The Journ. of the American Chemical Society, **51**, 2905.
 Michaelis, L. u. Pechstein, H.: Biochem. Zeitschr., **59**, 77.
 Norris, R. V.: Biochem. Journ., **7**, 622.
 Preti, L.: Biochem. Zeitschr., **4**, 1.
 Schermann, and Kendall: The Journ. of the American Chemical Society, **32**, 1087.
 Starkenstein, E.: Biochem. Zeitschr., **24**, 210.

A COLORIMETRIC MICRO METHOD FOR THE DETERMINATION OF PENTOSE.

By

KUNIHICO SUMINOKURA.

*(From the Laboratory of Biochemistry, Tottori Imperial
College of Agriculture, Tottori, Japan.)*

(Received for publication, June 5, 1931)

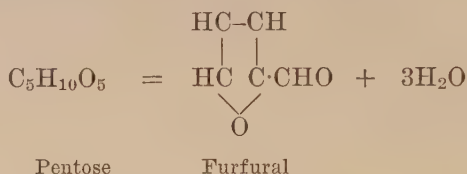
Pentoses and pentosanes are widely distributed in nature and constitute a large portion of the nitrogen-free extracts of many plants which form the greater portion of animal foods, and have been the subject of numerous experiments in animal metabolism. So it is evident that a convenient and accurate method for estimating these substances is very necessary.

I. METHODS OF DETERMINATION OF PENTOSE.

Methods of pentose determination consist of two principles. The one group of methods is based upon the direct reactions. This method, like the one used for determination of hexoses, generally measures the quantity of copper produced by the reduction of Fehling's solution with a pentose solution, and was first reported by W. E. Stone (1890) and improved later by Weiser and Zaitschek (1903), Eynon and Lane (1912); Baker and Hulton (1917). Pinoff and Gude (1896, 1913) determined pentoses spectroscopically by the color obtained from the alcoholic solution of pentoses warmed with concentrated hydrochloric acid and phloroglucinol, which is usually called the Tollens' reaction of pentoses. Scheff (1924) used Bial's reaction and he determined the color, which was produced when pentoses was warmed with orcinol, HCl and FeCl₃, spectroscopically, by its absorption-band and he tried to determine it, but these methods are, of course, not very easy methods.

The determination of pentoses has been made, however, chiefly by the second principle indirectly. In this principle pentoses is changed into furfural by distillation with concentrated acids and the amount of this furfural is determined.

As is well known pentoses are easily dehydrated by distilling them with concentrated acids and they yield furfural according to the following schema:



This reaction is very easy and under good conditions the yields are theoretical.

The acids used for the distillation of pentoses are mainly HCl (Tollens etc.), H_2SO_4 (P. Menaul and C. T. Dowell (1919)), and H_3PO_4 (G. C. Youngburg (1927)). F. Mann, M. Kruger and Tollens (1896) reported that the use of phosphoric acid causes the production of more huminsubstances and less furfural, while G. C. Youngburg (l. c.) gained satisfactory results. Phosphoric acid is not so cheap and in higher temperatures it corrodes glass and breaks it easily. Hydrochloric acid is the one chiefly used for the distillation of pentoses, but this acid is easily evaporated so that it causes a change in the concentration and the decomposition of the furfural produced. (D. Menaul and C. T. Dowell (l. c.), and my experiments). Distillation with such volatile acid is, therefore, not reasonable.

Furfural, like other volatile organic substances, is distilled with steam very easily, so the steam distillation is very suitable for the pentose determination. (N. C. Pervier and R. A. Gortner (1923), W. S. Hoffmann (1927), G. E. Youngburg (l. c.)).

Furfural is liable to be autoxidized when exposed to an air, and to avoid its oxidation it is necessary to distill it in the current

of carbon dioxide (P. Fleury and G. Poirot, 1923). The solubility of furfural, like that of many other organic substances, is lowered by saturation of neutral salts. I found further that the formation of furfural from pentoses, is catalysed by ZnSO_4 . From these considerations, I distilled the sample with neutralsalt-saturated non-volatile acid with ZnSO_4 by steam and CO_2 , and gained satisfactory results.

The determination of furfural has been made by any one of the following four methods:

1. Precipitation of the furfural as phloroglucide.
2. Precipitation as hydrazone.
3. Electro-method.
4. Colorimetric Method.

In the first method furfural is determined as furfural phloroglucide (Tollens, 1900 and 1901, Oshima and Kondo, 1926 and many other authors). This is the most popular method but not a very good one. When distilled with hydrochloric acid, furaloide is produced beside furfural and is precipitated with phloroglucine as phloroglucide (G. S. Fra ps, 1901), contaminating thus furfural-phloroglucide. Many aldehydes, as methylfurfural, methoxyfurfural (Pervier and Gortner, 1923), formaldehyde, acetaldehyde, vanillin and piperonal, react with phloroglucinol hydrochloric acid solution and yield also scarcely soluble precipitates. So, the phloroglucide precipitate is not only specific for furfural but also yields a phloroglucide of inconstant composition (R. Jäger and E. Unger, 1903; N. C. Pervier and R. A. Gortner, 1923). The hexoses yield oxymethylfurfural with the same treatment and the oxymethylfurfural with phloroglucinol yields non-soluble phloroglucide precipitate. (F. W. Klingstedt, 1925). So this method is not only unavailable for micromethod but gives no exact results.

The second and the third methods are unreliable or difficult to perform (Suminokura and Nakahara, 1928) and only the

fourth method is left as the method to be recommended for its easiness of treatment and for its giving very good results.

P. Fleury and G. Poirot (1922) make use of the Bial's orcinol reaction as colorimetric determination and McCance (1926) has extracted the furfural distillate with benzin and the color which is developed by benzidine reagent is colorimetrically determined.

W. S. Youngburg and Pucher (1924), Youngburg (1927) and W. S. Hoffmann (1927) have determined the furfural using the color obtained with aniline and acetic acid, after the first observation of Förster (1882), Schiff (1887) tested furfural with xyldine and acetic acid and found that the red color developed is stronger than the aniline color. I (Suminokura and Nakahara, 1928) found that the new method with xyldine and acetic acid is very accurate and easy and is more satisfactory than any other method, in the following points.

1. The color intensity of the furoxyldine in acetic acid is 1.8 time stronger than that of the furaniline, so the accuracy of the xyldine method is double that of the aniline method.

2. The aniline color is influenced by the presence of neutral salts, acids and bases and this fact has a great influence on the result of pentose determination, as by the usual method the sample is distilled with volatile acid as HCl. To avoid it, Hoffmann (1927) attempts to improve the Youngburg's colorimetric method, in neutralizing the distillate before coloration and in keeping the concentration of NaCl at a constant percentage. The influence of NaCl upon the color intensity of furoxyldine can not be recognised.

3. By the reaction of furfural with aniline, the color increases its intensity to a maximum after half an hour and then decreases, remaining for a very short time at the maximum. The xyldine color also increases and decreases its intensity as the aniline color but it keeps a constant maximum intensity for a very long time, and especially in the cold it is retained for many hours.

4. Xylidine produces no coloured substances with aldehydes as formaldehyde, acetaldehyde, vanillin, piperonal, methylfurfural, beside furfural. With oxymethylfurfural it produces a very faint color, but the oxymethylfurfural is very easily decomposed by warming it with acids, so that it has practically no source of error in the determination of pentoses. Xylidine produces no colored substances, neither with formic acid nor laevulinic acid, which are produced by the distillation of sugar with acids, and this is also very desirable for the colorimetric determination of pentoses.

The intensity of xylidine color is proportional to the concentration of furfural in wide ranges (Suminokura and Nakahara, 1928), and the highest coloration appears in the furfural solution by the addition of 10% xylidine and 50% acetic acid. The maximum intensity holds, for several hours, unchanged, so the furfural can easily and accurately be determined by the comparison of the intensity of furoxylidine color.

II. THE METHODS OF DETERMINATION.

Place a quantity of the substance to be determined, containing about 1–20 mg of pentoses or pentosanes, in the reaction bottle (Fig. 1 A) of the distillation apparatus shown in Fig. 1; add 30 cc. of 12.5 n H_2SO_4 saturated with K_2SO_4 at room temperature and 2 gm. of recrystallized ZnSO_4 , then immerse the reaction bottle in an oil bath previously heated to about 150°C . Shut at the stopcock (H) causing the influx of a current of steam with CO_2 and distill at about 150°C into 100 cc. measuring flask as receiver. Distillation is regulated so as to distill about 90 cc. in 20–25 minutes by the current of steam and CO_2 from Kipp's apparatus.

When it has distilled about 90 cc., change the receiver, and fill the receiving measuring flask with distilled water to the mark at 15°C , and make the fraction. Distillation is discontinued when the distillate becomes discolored by adding xylidine and acetic acid.

As each fraction of distillate is obtained, transfer exactly 5 or 10 cc. to another 25 cc. measuring flask, containing 2.5 cc. Xylidine

and 12.5 cc. acetic acid, and fill with water to the mark and compare the color produced with the standard solution. As the standard, I take a freshly distilled furfural solution of known concentration, but as usual the concentration must not differ very much from that of the measuring liquid. Both solutions must be taken at the same time and treated the same, and after standing 30 minutes in a water bath of 15°C, the color intensities should be compared by colorimeter. If the color of the liquid is too deep, it may be diluted with a mixture of xylidine, acetic acid and water in the proportions above stated.

The calculation of furfural will of course depend on the number of distillates consolidated. From the furfural obtained is calculated the yield of pentose and pentosane, using the following conversion factors:

As arabinose	Furfural found $\times 1.802$
As xylose	„ „ $\times 1.605$
As pentoses	„ „ $\times 1.704$
As pentosanes	„ „ $\times 1.499$

III. DISTILLATION APPARATUS.

The distillation apparatus used is shown in Fig. 1.

It is essentially a reaction bottle (A) (30 cc.) containing the reaction mixture and is connected with a steam generator (D) and with a condenser, by ground joint. The connecting tube from the head of reaction bottle to the condenser (K) must be as short as possible and the ground joint of the bottle (A) must be outside of the stopper which provides an inlet tube to the bottom of the reaction bottle (A) on account of bubbling with steam and CO₂.

A convenient form of steam generator is a 1 L flask with the tube and stopper with two inlet tubes, one of which is for filling water and the other is for bubbling with CO₂, which is generated in a Kipp's CO₂-generator and bubbled through two washing bottles filled with saturated NaHCO₃ solution.

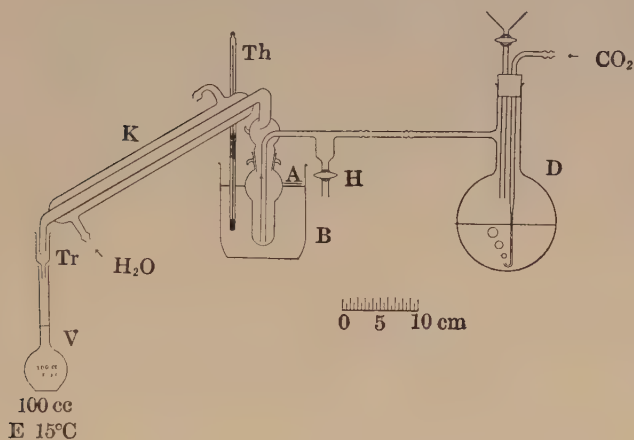


Fig. 1.

Distillation apparatus of the Pentose determination.

(B) is an oil bath provided with a thermometer (Th), previously warmed to 150°C and in which is immersed the reaction bottle, at the beginning of distillation. (V) is a 100 cc. measuring flask, as a receiver, with a tubulous funnel (Tr).

IV. EXPERIMENTS.

I. Distillation of hydrochloric acid.

400 cc. of hydrochloric acid in a distillation flask was taken and distilled, on a wire gauze. Each 50 cc. of distillate was collected as a fraction and titrated with n-NaOH.

II. Distillation of hydrochloric acid by steam.

50 cc. 4 n-HCl in a steam distillation flask was taken and distilled with a moderate current of steam. The fractions are 20 cc. of distillate, titrated with n-NaOH.

TABLE I.

Fraction	With 10% HCl		With 15% HCl		With 20% HCl	
	Amount of n-NaOH used	Temp. of vapor	Amount of n-NaOH used	Temp. of vapour	Amount of n-NaOH used	Temp. of vapour
No. 1	3 cc.	103°C	34 cc.	105°C	167 cc.	107°C
2	3 "	103 "	100 "	106 "	246 "	107 "
3	9 "	105 "	184 "	107 "	281 "	108 "
4	49 "	107 "	254 "	107 "	296 "	108 "
5	196 "	108 "	285 "	107 "	303 "	108 "
6	276 "	108 "	298 "	108 "	305 "	108 "
7	306 "	108 "	303 "	108 "	304 "	109 "

TABLE II.

Fraction	Amount of n-NaOH to neutralize each fraction
1	1.6 cc.
2	2.0 "
3	1.6 "
4	1.6 "
5	1.2 "
6	1.2 "
7	0.8 "
8	0.8 "
9	0.8 "
10	0.8 "

III. Decomposition of furfural by HCl.

After heating a furfural HCl-solution in a bath with reflux condenser, I determined the remaining furfural by colorimetric method (Suminokura and Nakahara, 1928).

(I) Temperature of bath is 100°C. (In boiling water bath.)

TABLE III.

No.	% of HCl	Time to warm	Furfural		
			taken	found	% decomposed
1	10 %	1 hour	60 mg	56.2 mg	6.3 %
2	"	2.5 "	51.2 "	46.2 "	8.8 "
3	"	5 "	88.4 "	50.2 "	43.8 "
4	15 "	1 "	60 "	51.5 "	14.2 "
5	"	2.5 "	51.2 "	38.7 "	24.4 "
6	"	5 "	88.4 "	22.4 "	74.7 "
7	20 "	1 "	60 "	45.8 "	23.7 "
8	"	2.5 "	56 "	23.1 "	58.8 "
9	"	5 "	88.4 "	trace	—

(II) Temperature of bath is 107°C. (In boiling bath of saturated NaCl solution.)

TABLE IV.

No.	% of HCl	Time to warm	Furfural		
			taken	found	% decomposed
1	10 %	15 min.	103.9 mg	93.9 mg	9.6 %
2	"	30 "	68.7 "	61.6 "	10.4 "
3	"	60 "	120.4 "	104.3 "	13.4 "
4	12.5 "	15 "	103.9 "	86.7 "	16.6 "
5	"	30 "	68.7 "	55.0 "	19.9 "
6	"	60 "	120.4 "	90.3 "	25.0 "
7	15 "	15 "	103.9 "	75.2 "	27.6 "
8	"	30 "	68.7 "	48.4 "	29.5 "
9	"	60 "	120.4 "	77.4 "	35.7 "

It is evident that the loss of furfural warmed with HCl is fairly great, and with 12.5% HCl after the method of Tollens, decomposes 16.6% in 15 minutes. This experiment shows, that the pentose sample must not be distilled with volatile acids such as

HCl, and that as the furfural formed must be carried out from the acid as soon as possible, the distillation apparatus must have a very short neck.

IV. Distillation of furfural by steam.

Furfural was distilled by steam in various conditions and distilled furfural is determined by colorimetric method. Each 20 cc. of distillate makes a fraction and distillation continued till no coloration with xylidine and acetic acid developed.

TABLE V.

No.	Condition	Furfural				
		Taken	Found			
			I fraction	II fraction	Total	% regained
1	With 30 cc. water	13.70 mg	13.396 mg	—	13.396 mg	97.8%
2	With 30 cc. cold saturated NaCl solution in water	10.10 „	10.101 „	—	10.101 „	100.0 „
3	With 30 cc. 12% HCl	10.89 „	8.712 „	0.102mg	8.814 „	80.9 „
4	With 30 cc. cold sat. NaCl sol. in 12% HCl	10.89 „	9.723 „	0.027 „	9.750 „	89.5 „
5	With 30 cc. 12.5 n-H ₂ SO ₂	10.35 „	10.000 „	0.067 „	10.067 „	97.4 „
6	With 30 cc. cold sat. K ₂ SO ₄ sol. in water	10.35 „	9.628 „	—	9.628 „	93.0 „
7	With 30 cc. cold sat. K ₂ SO ₄ sol. in 12.5 n-H ₂ SO ₄	10.35 „	10.197 „	—	10.197 „	98.5 „
8	Do. and bubbled with CO ₂	11.32 „	11.320 „	—	11.320 „	100.0 „

V. Influence of the concentration of sulfuric acid upon the yield of furfural from arabinose.

5 cc. solution containing 10 mg of arabinose in water was taken and K₂SO₄ saturated sulfuric acid of various concentration and

2 gm. of pure ZnSO_4 were added and were distilled by steam and CO_2 . Furfural distilled is determined by colorimetric method. The temperature of the bath was maintained at about 150°C .

TABLE VI.

No.	Concentration of H_2SO_4	Yield of furfural
1	5 n	4.444 mg
2	7.5 „	4.779 „
3	10 „	4.890 „
4	12.5 „	5.578 „
5	15 „	4.598 „
6	20 „	1.810 „

Distillation with 12.5 n- H_2SO_4 gives the maximum yield of furfural.

VI. Influence of the temperature of oil bath to the yield of furfural from arabinose.

5 cc. water solution containing 10 mg arabinose was taken, distilled by steam with 30 cc. of K_2SO_4 cold saturated 10 n- H_2SO_4 and 2 g of ZnSO_4 , and the reaction bottle immersed in an oil bath of various temperatures. Furfural distilled is determined by colorimetric method.

TABLE VII.

No.	Temperature of bath	Yield of furfural
1	120°C	0.998 mg
2	130°	2.397 „
3	140°	2.971 „
4	150°	4.889 „
5	160°	4.819 „
6	170°	4.667 „

By the experiment the suitable temperature for the bath was found to be 150°C.

VII. *Catalyser.*

I tried many metal sulfates as catalyser of furfural formation and found that ZnSO_4 has some catalytic action on it. Arabinose added 10 n- H_2SO_4 cold saturated with K_2SO_4 and various metal sulfates and distilled by steam and furfural were determined by colorimetric method. The temperature of bath maintained was about 150°C.

TABLE VIII.

No.	As catalyser ~	Yield of furfural(*)	CO_2
1	NiSO_4	65.7 %	Without
2	CuSO_4	63.4 "	"
3	ZnSO_4	68.8 "	"
4	Without	67.2 "	With
5	ZnSO_4	76.5 "	"
6	Hg	67.3 "	"

(*) Yields are denoted with % of the theoretical yield.

VIII. *Yields of furfural from arabinose with various amounts of ZnSO_4 .*

5 cc. solution containing 10 mg of arabinose with 10 n- H_2SO_4 saturates with K_2SO_4 in the cold and various amounts of ZnSO_4 were taken in the reaction bottle, immersed in oil bath of 150°C, and distilled by steam and CO_2 . Furfural distilled is determined by colorimetric method.

The experiment shows that 2 gm. of ZnSO_4 is suitable for pentose distillation.

TABLE IX.

No.	Amount of ZnSO_4	Yield of furfural
1	—	4.779 mg
2	0.5 gm	4.857 „
3	1 „	4.816 „
4	2 „	5.438 „
5	3 „	5.277 „

IX. Conversion factors.

(I) For arabinose.

Various amounts of pure arabinose were taken and the yield of furfural was determined by the colorimetric method.

TABLE X.

No.	Amount of arabinose taken	Yield of furfural	Yield of furfural per mg of arabinose
1	5 mg	2.786 mg	0.557 mg
2	5 „	3.758 „	0.552 „
3	5 „	2.716 „	0.543 „
4	10 „	5.460 „	0.546 „
5	10 „	5.515 „	0.552 „
6	10 „	5.460 „	0.546 „
7	15 „	8.951 „	0.597 „
8	20 „	10.393 „	0.520 „
9	30 „	17.050 „	0.568 „
			Mean = 0.555 „

$$\text{Conversion factor: } \frac{1.000}{0.555} = 1.802$$

(II) For xylose.

Various amounts of pure xylose were taken and the yield of furfural was determined by the colorimetric method.

TABLE XI.

No.	Amount of xylose taken	Yield of furfural	Yield of furfural per mg of xylose
1	10 mg	6.135 mg	0.614 mg
2	10 "	6.122 "	0.612 "
3	10 "	6.333 "	0.633 "
4	10 "	6.261 "	0.626 "
5	15 "	9.254 "	0.617 "
6	20 "	12.409 "	0.620 "
7	25 "	15.500 "	0.620 "
8	25 "	15.326 "	0.613 "
9	30 "	18.685 "	0.623 "
10	30 "	18.944 "	0.631 "
			Mean=0.623 "

$$\text{Conversion factor: } \frac{1.000}{0.623} = 1.605$$

(III) For pentoses.

Assuming that various plants have practically the same amount of arabinose and xylose, I calculated the conversion factor for pentoses as follows:

$$\text{Conversion factor: } \frac{1.802 + 1.605}{2} = 1.704$$

(IV) For pentosanes.

For pentosanes, I calculated it as the anhydride of pentoses, so must multiply the factor of pentoses by 0.87996.

$$\text{Conversion factor: } 1.704 \times 0.87996 = 1.499$$

*X. Yield of furfural from various substances
by this method.*

The purest substances obtainable were used.

TABLE XII.

Substance	Taken	Yield of furfural	Prepared by
Adonit	6.334 mg	0 mg	E. Merck
Amygdalin	7.577 "	0.024 "	"
Aesculin	6.476 "	0 "	"
Aloin	16.877 "	0 "	"
Gum arabic	24.500 "	7.853 "	Ph. J.
Arbutin	8.715 "	0 "	E. Merck
Bryonin	8.171 "	0 "	"
Condurangin	5.740 "	0 "	"
Convallamarin	7.562 "	trace	"
Convallarin	7.960 "	trace	"
Cyclamin	8.683 "	0.106 mg	"
Digitonin	8.323 "	0.048 "	"
Digitalin germanicum	8.243 "	0.199 "	"
Digitoxin	9.092 "	0 "	"
Erythrit	8.532 "	0 "	"
Fucose	10.000 "	0 "	Our Lab.
Glucose anhydride	10.000 "	0 "	E. Merck
Glycogen	14.073 "	trace	"
Gratiolin	9.100 "	0 mg	"
Helleborein	7.725 "	0.020 "	"
Hesperidin	7.615 "	0 "	"
Inulin	13.325 "	0 "	"
Laevulose (Fructose)	10.000 "	0 "	"
Mannose	100.000 "	1.576 "	"
Mannit	23.812 "	0 "	"
Melampyrit (Duleit)	19.283 "	0 "	"
Nucleic acid (Yeast)	16.395 "	7.437 "	"
Ononin	5.523 "	0 "	"
Ouabain	22.281 "	0 "	"
Populin	6.621 "	0 "	"
Phloridzin	7.860 "	0 "	"
Plumierid	11.683 "	0 "	"
Quercitrin	10.000 "	0 "	Kahlbaum
Rhamnose	22.184 "	0 "	E. Merck
Starch (soluble)	18.560 "	0 "	Kahlbaum
Salicin	9.779 "	0 "	E. Merck
Saponin	8.449 "	0.081 "	"
Sorbit	7.595 "	0 "	"
Strophantia (cryst.)	18.027 "	0 "	"
Sucrose	10.000 "	0 "	Our Lab.

VI. SUMMARY.

1. Pentoses may be determined in a micro method by distilling it with sulfuric acid of 12.5 n cold saturated with K_2SO_4 and using zinc sulfate as catalyser and the distillation carried with steam and CO_2 satisfactory. The furfural formed is determined with xyloidine and acetic acid colorimetrically.

2. By this method methylpentoses and hexoses are without any effect whatsoever, so one can determine pentoses only in substances which contain many other carbohydrates.

3. This method can be carried out in a short time with very little material and expense, so the method may be of value in biochemical work and for other purposes.

REFERENCES.

- Baker, J. L. and Hulton, H. F. E. (1917): *The Analyst*, **43**, 294.
Eynon and Lane (1912): *The Analyst*, **37**, 41.
Fleury, P. et Poirot, G. (1922): *J. pharm. et chim.*, (7), **26**, 87.
Fraps, G. S. (1901): *Amer. Chem. J.*, **25**, 501.
Förster, K. B. (1882): *B. d. Deut. Chem. G.*, **15**, 322.
Hoffmann, W. S. (1927): *J. of Biol. Chem.*, **73**, 15.
Jäger, R. und Unger, E. (1903): *B. d. Deut. Chem. G.*, **35**, 4440.
Klingstedt, F. W. (1925): *Z. f. Analy. Chem.*, **66**, 129.
Ménaul, P. und Dowell, C. T. (1919): *J. Ind. and Eng. Chem.*, **11**, 1024.
Mann, F., Krüger M. und Tollens, B. (1896): *Z. Angew. Chem.*, **9**, 33.
McCance, R. A. (1923): *Biochem. J.*, **20**, 1111.
Oshima, K. and Kondo, K. (1923): *J. of Hokkaido Imp. University, Japan*.
Pinoff, E. (1896): *B. d. Deut. Chem. G.*, **29**, 1202.
Pinoff, E. und Gude, K. (1913): *Chem. Ztg.*, **37**, 621.
Pervier, N. C. and Gortner, R. A. (1923): *J. of Ind. and Eng. Chem.*, **15**, 1167; **15**, 1256.
Stone, W. E. (1890): *B. d. Deut. Chem. G.*, **23**, 3795.
Scheff, G. (1924): *Bioch. z.* **147**, 90; **147**, 94.
Suminokura, K. and Nakahara, Z. (1928): *Transaction of the Tottori Society of Agricultural Science*, **1**, 149.
Schiff, H. (1887): *B. d. Deut. Chem. G.*, **20**, 540.
Tollens, B. (1900): *J. f. Landw.*, **48**, 357; (1901): **49**, 7.

Weiser und Zaitschek (1903): Landw. Versuchs-Station, **58**, 219.

Youngburg, G. E. (1927): J. of Biol. Chem., **73**, 599.

Youngburg, G. E., and Pucher, G. W. (1924): J. of Biol. Chem., **61**,
741.

ÜBER DIE URIKASE.

VON

KISHUN RO.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)

(Eingegangen am June 5, 1931)

EINLEITUNG.

Fülle hat behauptet, dass im menschlichen Körper als Stoffwechselprodukt des Purins im Harn Harnsäure ausgeschieden werde, während beim Tier, besonders beim Rind, Pferd, Hund und Kaninchen 70–80% desselben als Allantoin ausgeschieden würden. Man hat auch festgestellt, dass bei purinreicher Nahrung der Harnsäuregehalt des Harns beim Menschen zunimmt, während im gleichen Falle beim Tiere der Allantoingehalt zunimmt. Bei Injektion von Harnsäure scheidet der Mensch dieselbe als Harnsäure wieder aus, das Tier aber als Allantoin. Demnach scheint anders als beim Menschen bei den Tieren die Harnsäure zu Allantoin oxydiert zu werden.

Jakowy (1899) beobachtete in den Organgewebe von Tieren ein Ferment, das die Harnsäure in Kohlensäure und Allantoin spaltet, und nannte es Urikase (urikolytisches Ferment).

Wiener (1905) isolierte die Urikase aus der Rinderniere; und danach haben verschiedene Autoren anerkannt, dass es sich um ein Sauerstoff aktivierendes Ferment handele, doch ist man sich über dessen eigentliche Eigenschaften noch nicht klar.

Neuerdings hat Przylecki (1928) die verschiedenen Eigenschaften dieses Ferments eingehend untersucht und hat uns einen eingehenden Bericht über die von ihm erhaltenen Ergebnisse geliefert.

Auch ich habe mich seit 2 Jahren mit dieser Frage beschäftigt. Bei meinen Versuchen war mir zunächst daran gelegen, das Ferment möglichst rein zu erhalten. Als nächste Aufgabe lag vor mir die Frage des Zusammenhangs zwischen der Fermentwirkung und dem Schwermetallgehalt des Ferments, da nach Warburg die Schwermetallkatalyse bei der biologischen Katalyse eine wichtige Rolle spielen soll. Weiter habe ich den Einfluss verschiedener äusserer Faktoren auf mein Fermentpräparat eingehend studiert.

Obwohl die Ergebnisse nicht das gezeitigt haben, was ich erhofft hatte, so habe ich doch einige interessante Befunde erhalten, die wohl der Veröffentlichung wert scheinen.

Zur Bestimmung der Aktivität der Urikase habe ich eine genau gemessene Harnsäure-Menge dem Ferment zugefügt und nach einer gewissen Zeit den ungespaltenen Teil der Harnsäure kolorimetrisch nach Benedikt und Frank (1922) bestimmt. Die Harnsäurelösung, die dazu angewandt wurde, habe ich in der folgenden Weise hergestellt: 0.1680 g Harnsäure wurden genau gemessen und in destilliertem Wasser suspendiert, dazu tropfenweise $m/10$ Lithiumhydroxyd-Lösung zugesetzt und nach vollständiger Lösung mit $m/10$ Salzsäure oder $m/10$ Essigsäure neutralisiert, sodann mit destilliertem Wasser auf 100 ccm aufgefüllt. Die Endkonzentration dieser Lösung betrug $m/100$ und 1 ccm enthielt 1.6806 mg Harnsäure. Da diese Lösung sich leicht verändert, habe ich sie alle 5 Tage neu hergestellt.

I. DARSTELLUNG DES FERMENTS.

Das allerwichtigste für meine Versuche war natürlich einen Weg zu finden, auf dem das Ferment möglichst rein dargestellt werden konnte.

Schon Wiener (1905), Schittenhelm (1905), Batteri und Stern (1909), Galeotti (1911), Felix und Scheel (1929) haben aus verschiedenen Organgeweben ein Ferment, und Przylecki (1928) aus den Froschmuskeln ein stark aktives, dialysierbares Ferment isoliert.

Die Versuche der obengenannten Forscher habe ich nachgeprüft. Doch da ich gefunden habe, dass die so erhaltenen Präparate unrein und zu den verschiedenen Versuchen daher ungeeignet sind, habe ich folgende eigene Methode erdacht:

Von Rindernieren habe ich die Kapseln und das Fettgewebe vorsichtig entfernt und die Nieren dann mit der Fleischhackmaschine zerkleinert. Die weitere Zerkleinerung geschah im Mörtel mit dem Pistill, und dem Brei wurde die gleiche Menge destilliertes Wasser und zur Desinfektion die nötige Menge Thymol zugesetzt. Danach wurde ab und zu geschüttelt, das Gemenge dann bei einer Temperatur von unter 10°C stehen gelassen, wodurch die wichtigsten Bestandteile extrahiert wurden. Durch Filtrieren durch dreifache Gaze unter leichtem Pressen wird ein dunkelrotes, getrübbtes Extrakt erhalten. Durch Zusatz einer gleichen Menge Aceton (Merck) und Umrühren entsteht ein flockiger Niederschlag. Wenn man dann nach 30 Minuten dekantiert und dem Niederschlag das drei- bis vierfache an destilliertem Wasser zusetzt und diese Manipulation 3-4 mal wiederholt, um das Hämoglobin zu entfernen, dann erhält man ohne Fermentverlust einen entfärbten, weisslichen Niederschlag. Diesem Niederschlag wird 70%iger Alkohol zugesetzt, nach 3 Minuten zentrifugiert, dekantiert, die dreifache Menge 95%iger Alkohol zugesetzt, umgerührt, nach 3 Minuten zentrifugiert und dann wieder dekantiert. Dem Bodensatz wurde dann die 3fache Menge Äther zugesetzt, umgerührt und nach drei Minuten filtriert. Der Bodensatz wurde dann angesammelt und mit einem Glasstäbchen zerkleinert. Darauf habe ich den Äther in einem Wasserbad von 37°C schnell abgedampft und erhielt nach dem Trocknen ein weissliches Pulver. Von 100 g der Rinderniere erhält man etwa 10 g eines solchen Pulvers.

Wenn die Aussentemperatur niedriger als 10°C ist, dann bleibt die Aktivität des Ferments auch noch mehrere Stunden nach dem Tode der Tiere und bei Behandlung bei Zimmertemperatur unverändert; aber wenn wie im Sommer die Aussentemperatur

über 20°C beträgt, dann ist bald nach dem Tode der Tiere die Extraktion der Niere in der Eiskammer und auch die weitere Behandlung unter Abkühlung vorzunehmen, da sonst die Aktivität des Ferments abgeschwächt wird oder ganz und gar erlischt. Wenn die Aussentemperatur über 20°C beträgt und die Extraktion bei Zimmertemperatur zu spät vorgenommen wird, dann wird wahrscheinlich durch Autolyse Säure gebildet; Ph neigt dann nach der Säureseite, und es wird das Ferment durch die Säurewirkung inaktiv.

Um aus dem so hergestellten Pulver die wirksamen Bestandteile auszuziehen, habe ich zu 0.1 g desselben 10 ccm destilliertes Wasser oder alkalische Lösungen in verschiedener Konzentration hinzugegeben. Die Extraktion dauerte 30 Minuten bei 30°C. Um den Fermentgehalt im Extrakt zu bestimmen, wurde 1 ccm von Harnsäurelösung, welche 1.68 mg der Substanz enthält, den 5 ccm des Extraktes zugesetzt. Nach Inkubation auf 45°C für 60 Minuten wurde die ungespaltet gebliebene Harnsäuremenge kolorimetrisch bestimmt. Die Resultate sind in der Tabelle I zusammen gestellt.

TABELLE I.

Konz. d. Na ₂ CO ₃ (%)	2	1	0.5	0.25	0.125	0.06	0.03	0.015	Aq. dest.
Zersetzte Harnsäure in mg	0	0.56	0.85	1.12	1.68	1.13	0.42	0	0

Wie die Tabelle I zeigt, ist für diesen Zweck eine 0.125%ige Natriumkarbonat-Lösung am zweckmässigsten. Eine 2%ige Natriumkarbonat-Lösung ist zu stark; das Ferment wird dadurch zersetzt.

Ph des Filtrats von 0.1 g Pulver, das mit 10 ccm einer 0.1%igen Natriumkarbonat-Lösung extrahiert wurde, beträgt 9.3. Dieses Extrakt bezeichne ich als Urikase-Lösung.

Versuch einer weiteren Reinigung:

Um festzustellen, ob ich nicht eine noch stärker aktive Urikase

erhalten könne, habe ich die Urikase-Lösung durch verschiedene Adsorptionsmittel adsorbieren lassen. Der Versuch war aber erfolglos.

1.) Tierkohle (Merck). Wenn man zu 10 ccm Urikase-Lösung, sei sie alkalisch oder neutralisiert, 0.5 g Tierkohle zusetzt, ab und zu umrührt und 1 Stunde stehen lässt, dann wird das wirksame Ferment nicht vollständig adsorbiert. Selbst wenn man das adsorbierte Ferment danach noch mit sekundärer Natrium-Phosphat-Lösung behandelt, ist eine stärker aktive Urikase nicht zu erhalten. Ich habe deshalb weiterhin untersucht, ob nicht vielleicht durch die Tierkohle die der Urikase-Lösung beigemischten unreinen Substanzen resorbiert werden, und die aus der Lösung nicht resorbierten Stoffe ein wirksameres Ferment darstellen.

Zu diesem Zwecke habe ich zu 10 ccm der Urikase-Lösung 0.3 g Tierkohle zugesetzt, geschüttelt, nach 30 Minuten zentrifugiert, der überstehenden Flüssigkeit abermals 0.2 g Tierkohle zugesetzt, nach 30 Minuten wieder zentrifugiert, der überstehenden Flüssigkeit wieder 0.1 g Tierkohle zugefügt und nach 30 Minuten wieder zentrifugiert. Die erhaltene Flüssigkeit und die durch die gleiche Behandlung erhaltene neutralisierte Urikase-Lösung habe ich dann bezüglich ihrer Fermentwirkung miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die Fermentwirkung proportional der adsorbierten Eiweissmenge vermindert wird. Durch Behandlung ist also eine reinere und stärker wirkende Urikase nicht zu erhalten.

2.) Aluminiumhydroxyd.—Ich habe dieses Reagens frisch hergestellt, indem ich Ammoniak auf Chloraluminium einwirken liess und von dem Aluminiumhydroxyd 0.5 ccm (als Gewicht 0.14 g) zu 5 ccm der Urikase-Lösung hinzusetzte. Dann wurde stark geschüttelt und 30 Minuten stehen gelassen. Das Ferment wurde zwar vollständig resorbiert, aber ein Ferment, das stärker wäre als die ursprüngliche Urikase-Lösung, wurde nicht erhalten.

3.) Kaolin.—Ich habe zu 0.5 g Kaolin (Merck) 5 ccm Urikase-Lösung zugesetzt und gut geschüttelt. Nach 30 Minuten wurde das Ferment vollständig resorbiert, doch war es nicht möglich, es

wieder zu gewinnen.

4.) Saurer, weisser Ton (ein besonderer japanischer Ton mit kräftiger Adsorptionswirkung).—Zu 5 ccm Urikase-Lösung habe ich 0.5 g sauren, weissen Ton zugesetzt und dann geschüttelt. Das Ferment wurde zwar ganz adsorbiert, doch war es auch hier nicht möglich zu eluieren.

Da diese Adsorptions-Versuche zeigten, dass die Fermentwirkung mit dem Eiweiss eng verknüpft ist, habe ich festzustellen gesucht, in welcher Eiweiss-Fraktion das Ferment am besten präzipitiert werden kann. Ich habe zu 5 ccm der Urikase-Lösung gesättigte Ammonsulfatlösung in einem Verhältnis von 4–6–8–10 ccm zugesetzt und so festzustellen versucht, bei welchem Verhältnis das Eiweiss am besten ausfällt. Darauf habe ich dann die urikolytische Wirkung des Niederschlages untersucht. Bei diesen Versuchen habe ich gefunden, dass die urikolytisch wirksame Substanz mit dem Eiweiss ausfällt. Die urikolytische Wirkung der Flüssigkeit, die man durch Lösen des Niederschlages in 0.1%igem Natriumkarbonat erhält, ist der ausgefällten Eiweissmenge proportional, was also sagen will, dass der wirksame Bestandteil der Urikase, mittels Ammonsulfats fraktioniert, nicht ausgefällt werden kann.

II. VORKOMMEN DER URIKASE IN VERSCHIEDENEN ORGANGEWEBEN.

Ob die Urikase in den Organ Geweben des Menschen vorkommt oder nicht, ist eine Streitfrage. Croftan (1908) hat angeblich in dem Brei der menschlichen Leber und Niere durch Zusatz von Harnsäure und Stehenlassen während 48 Stunden deren Spaltung beobachtet. Wiechowski (1909) hat diese Versuche nachgeprüft und gefunden, dass selbst in einem sauerstoffhaltigen Medium eine vollständige Spaltung nicht stattfindet, dass es sich also bei der Beobachtung von Croftan nur um eine einfache hydrolytische Spaltung und nicht um eine urikolytische Wirkung handeln müsse.

Schittenhelm und Chrometzka (1927) haben mit Sicher-

heit gefunden, dass in der Menschenleber bald nach dem Tode, wenn sie mit einer Harnsäurelösung durchblutet wird, sich geringe Mengen Allantoin bilden, doch haben diese Autoren die Frage, ob es sich hier um eine urikolytische Wirkung oder eine spontane Spaltung handelt, absichtlich offen gelassen.

Verfasser hat von den Organgeweben verschiedener Säugetiere nach der gleichen Methode Pulver hergestellt und von diesen je 0.1 g mit 0.1%iger Natriumkarbonatlösung extrahiert. Den Extrakten wurde Harnsäure zugesetzt und bei gleicher Temperatur und Zeit die urikolytische Wirkung untersucht. In der menschlichen Leber und Niere habe ich, wie die Tabelle II zeigt, eine urikolytische Wirkung nicht feststellen können; unter den übrigen Säugetieren war diese in dem Extrakt des Rindernieren-Pulvers am stärksten. Deshalb habe ich dieses zu meinen Versuchen benützt. Es sei hier hinzugefügt, dass einige eigene Versuche über das Vorkommen des urikolytischen Ferments in Bakterien und Leukozyten negativ ausfielen.

III. ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN DER URIKASE UND IHR GEHALT AN SCHWERMETALLEN.

1. *Analytische Data.*—Die Urikase-Lösung ist eine Flüssigkeit von einem ganz schwach gelblichen Ton und einem eigentümlichen Geruch. Sie enthält in 100 cem 0.184 g feste Bestandteile und 0.027 g Asche. In 100 cem sind 44 mg Eiweiss enthalten. Die Biuret-Reaktion, die Millon'sche Probe und die Glyoxylsäureprobe fallen positiv, die Zucker-Reaktion dagegen negativ aus. Das Adsorptionsband ist nicht festzustellen, die Polarisationsdrehung ist null.

Kupfer-, Eisen- und Mangangehalt der Urikase-Lösung.—Die Urikase-Lösung enthält in 100 cem 0.033 mg Kupfer, 0.033 mg Eisen, aber kein Mangan. Der Kupfer- und Eisengehalt des Extrakts verschiedener Organgewebe in 100 cem ist in den Tabellen III und IV wiedergegeben. Nach meinen Erhebungen bestehen also zwischen dem Kupfer- und Eisengehalt und dem Ferment-

TABELLE II.
 Urikasegehalt in verschiedenen Organgewebe. 60 Minuten auf 45°C.

No.	Tierarten	Gewebeart	Extraktmenge: (Pulver 0.1 g + 0.1 % Na_2CO_3 10 ccm)	Zugesetzte Harnsäure mg	Zersetzte Harnsäure mg	Relativer Fermentgehalt (Rinderniere als 100)
1	Rind	Niere	3	1.68	1.03	100
2	Pferd	Niere	"	"	0.66	64
3	Pferd	Leber	"	"	0.52	53
4	Frosch	Leber	"	"	0.52	53
5	Kaninchen	Leber	"	"	0.48	46.4
6	Hund	Leber	"	"	0.44	42.2
7	Hund	Niere	"	"	0.15	14.7
8	Kaninchen	Niere	"	"	0.08	7.7
9	Frosch	Muskel	"	"	0.08	7.7
10	Pferd	Lunge	"	"	0.08	7.7
11	Pferd	Milz	"	"	0.08	7.7
12	Mensch	Niere	"	"	0	0
13	Mensch	Leber	"	"	0	0
14	Rind	Leber	"	"	0	0
15	Rind	Milz	"	"	0	0

TABELLE III.
Kupfergehalt in verschiedenen Organ-Pulver-Extrakten.

No.	Gewebeart	Extraktmenge (Pulver 1.0 g + 0.1 % Na ₂ CO ₃ 100 cc)	Trockene Subst. g	Asche g	Cu mg	Relativer Fermentgehalt. (Rinderniere als 100)
1	Rinderniere	100 cem	0.184	0.027	0.033	100
2	Hundeleber	"	0.120	0.019	0.032	42.2
3	Menschenleber	"	0.134	0.011	0.030	0
4	Pferdeniere	"	0.120	0.045	0.023	64
5	Hundeniere	"	0.203	0.015	0.015	14.7
6	Pferdemilz	"	0.342	0.052	0.018	7.7
7	Rinderleber	"	0.217	0.065	0.011	0
8	Menscheniere	"	0.239	0.029	0.010	0
9	Pferdeleber	"	0.148	0.043	0.007	53.3
10	Kaninchenleber	"	0.055	0.015	+	46.4
11	Froschmuskul	"	0.239	0.017	+	7.7

TABELLE IV.
Eisengehalt in verschiedenen Organ-Pulverextrakten.

No.	Gewebeart	Extraktmenge (Pulver 1.0 g + 0.1 % Na ₂ CO ₃ 100 ccm)	Trockene Subst. g	Asche g	Fe g	Relativer Fermentgehalt. (Rinderniere als 100)
1	Pferdemilz	100 ccm	0.3	0.041	17.75	0
2	Menschenniere	"	2.238	0.029	0.050	0
3	Pferdeniere	"	0.208	0.046	0.041	64
4	Menschenleber	"	0.133	0.01	0.04	0
5	Pferdeleber	"	0.142	0.044	0.04	53.3
6	Rinderleber	"	0.193	0.043	0.038	0
7	Rinderniere	"	0.185	0.015	0.033	100

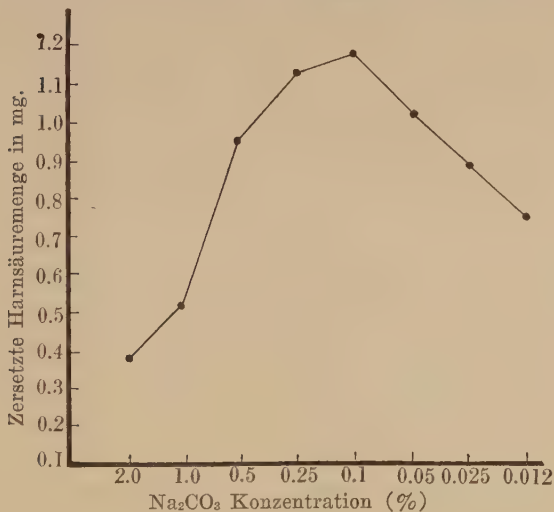
gehalt keine direkten Beziehungen, doch ist immerhin nicht gänzlich ausser Acht zu lassen, dass der Kupfergehalt der Rinderniere sehr reichlich ist.

2. *Spezifität der Fermentwirkung.*—Ich habe festgestellt, dass die Urikase für die Harnsäure spezifisch ist; Hypoxanthin, Hydrochinon und Xanthin werden von ihr nicht oxydiert. Um festzustellen, wie die Indophenol-Reaktion ausfällt, habe ich zu 2 ccm Urikase-Lösung 2 ccm m/150 a-Naphtol, 2 ccm m/150 p-Phenylendiamin und 3 ccm Borat-Puffer (Ph 9.3) zugesetzt, auf 38°C erwärmt und die Reaktionsgeschwindigkeit mit der der Kontrolle verglichen. Es zeigte sich, dass innerhalb 2 Stunden die Ver-
 verglichen. Es zeigte sich, dass innerhalb der ersten 2 Stunden die Verfärbung schwächer war als die der Kontrolle, danach aber stärker wurde als die der letzteren. Bei Zusatz von 1 Tropfen Wasserstoffsuperoxyd zu beiden zeigte die Urikase eine schnellere und stärkere Verfärbung als die Kontrolle. Daraus geht hervor, dass die Urikase Peroxydase enthält. Um zu entscheiden, ob das Urikase-Präparat eine Dehydrogenase enthält oder nicht, habe ich

den folgenden Methylenblau-Entfärbungsversuch unternommen.— Ich habe zu 2 ccm Urikase im Thunbergschen Rohr 0.1 ccm m/5000 Methylenblau-Lösung und 2 ccm Borat-Puffer (Ph 9.3) hinzugegeben, das Gefäß luftleer gemacht, und dann auf 38°C erwärmt. Nach 2 Stunden war noch keine völlige Entfärbung eingetreten. Darauf habe ich Bernsteinsäure als Donator hinzugesetzt, doch trat auch daraufhin keine Veränderung ein. Es geht also aus diesem Versuche hervor, dass in der Urikase keine Dehydrogenase vorhanden ist.

3. *Die optimale Ph für die Urikase-Wirkung.*— Zu 3 ccm Urikase-Lösung habe ich je 5 ccm Natriumkarbonatlösung verschiedener Konzentration hinzugefügt, die Ph verschieden reguliert, 1.68 mg Harnsäure zugesetzt und dann unter gleicher Behandlung nach 1 Stunde Einwirkung die zersetzte Harnsäure-Menge bestimmt. (Fig. 1). Aus der Figur geht hervor, dass die stärkste Wirkung der Urikase dann hervortritt, wenn man zu 3 ccm Urikase-Lösung 5 ccm 0.1%iges Natriumkarbonat (Ph 9.3) hinzusetzt. Das

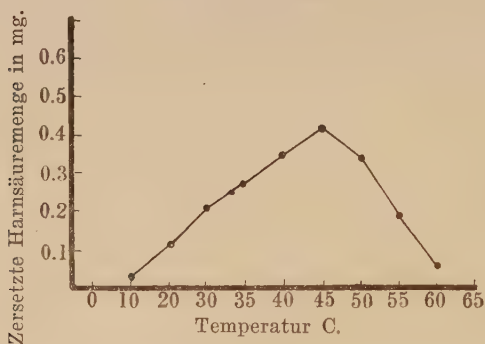
Fig. 1. Aktivitätskurve der Urikase bei verschiedener Na_2CO_3 Konzentration.



Optimum der Ph liegt also bei 9.3, und ich habe deshalb die Ph immer auf 9.3 reguliert.

4. *Das Temperatur-Optimum für die Urikase-Wirkung.*—Das Temperatur-Optimum für die Urikase Wirkung ist noch unbestimmt. Schittenhelm fand dieses bei 40°C, Batelli und Stern bei 50–55°C, wieder andere Forscher bei 38°C. Diese Unterschiede sind den verschiedenen Darstellungsmethoden zuzuschreiben. Ich habe mit meinem eigenen Präparat zur Feststellung des Temperatur-Optimums den nachfolgenden Versuch angestellt. Zu 3 ccm Urikase-Lösung habe ich 1 ccm einer m/100 Harnsäurelösung und 6 ccm Puffer (Ph 9.3) zugesetzt und das Ganze bei verschiedenen Temperaturen sich zersetzen lassen. Darauf wurde die zersetzte Harnsäure-Menge bestimmt. Wie Fig. 2 zeigt, ist die Wirkung der Urikase bei 45°C am stärksten, nach

Fig. 2. Einfluss der Temperatur auf die Urikasewirkung.



oben hin wird die Wirkung allmählich abgeschwächt, und bei 65°C erlischt sie schliesslich gänzlich. Eine Urikase-Lösung die bei 70°C 15 Minuten lang erhitzt wird, wird gänzlich zersetzt. Denn diese Lösung bei 0°C mehrere Tage lang stehen gelassen wird, so bleibt ihre Wirkungskraft völlig erhalten, ist aber bei 0°C sehr gering.

5. *Einfluss von Alkali und Säuren auf die Urikase.*—Zu diesen Versuchen habe ich zu 3 ccm Urikase-Lösung je 1 ccm einer

n/10, n/20, n/40, n/80, n/100 Natriumhydroxyd-Lösung zugesetzt, nach 30 Minuten wieder mit Salzsäure der gleichen Konzentration neutralisiert und 1.68 mg Harnsäure und 4 ccm Puffer zugesetzt. Nach 1 Stunde Wirkung habe ich dann die Fermentwirkung mit der der ursprünglichen Urikase-Lösung verglichen. (Tabelle V).

TABELLE V.
Einfluss von Alkali auf die Urikasewirkung.

No.	Urikase Menge ccm	NaOH Konzentration und Menge		Borat-Puffer (9.3) ccm	Zugesetzte Harnsäure mg	Zersetzte Harnsäure mg
		Normal	ccm			
1	3	$\frac{1}{10}$	1	4	1.68	0
2	3	$\frac{1}{20}$	1	4	"	0
3	3	$\frac{1}{40}$	1	4	"	0.86
4	3	$\frac{1}{80}$	1	4	"	0.86
5	3	$\frac{1}{160}$	1	4	"	0.86
Kon- trolle	3	0	0	6	"	0.86

Wie aus der Tabelle ersichtlich, erlischt die Wirkung vollständig, wenn 1 ccm n/20 Natrolauge zugesetzt, und nach 30 Minuten neutralisiert wird. Nach Zusatz von 1 ccm n/40 Natronlauge und Neutralisierung bleibt die Fermentwirkung jedoch noch intakt.

Ich habe auf elektrometrischem Wege die Ph der verschiedenen Lösungen bestimmt und wie folgt gefunden: (a) 3 ccm Urikase plus 1 ccm n/20 Netronlauge = Ph 11.26. (b) 3 ccm Urikase plus 1 ccm n/40 Natronlauge = Ph 10.97. (c) 3 ccm Urikase plus 1 ccm n/80

Natronlauge = Ph 10.25. (d) Urikase 0.1 g plus 10 ccm 2%iges Natriumkarbonat = Ph 10.75.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass bei einer Alkali-Konzentration von über Ph 11.2 das Ferment gänzlich zersetzt und inaktiv wird.

Weiter habe ich zu 3 ccm Urikase-Lösung je 1 ccm n/10, n/20, n/40, n/80, n/100 Salzsäure zugesetzt, nach 30 Minuten neutralisiert, 4 ccm Puffer (9.3 Ph) und 1.68 mg Harnsäure zugesetzt und nach 1 Stunde langer Wirkung die gesamte Fermentwirkung untersucht. Wie die Tabelle VI zeigt, ist die Wirkung der Lösung, der n/80 Salzsäure zugesetzt wurde, der der originalen Lösung ganz gleich, während die der n/20 Salzsäure zugesetzt wurde, absolut keine Fermentwirkung mehr besitzt. (Die Bestim-

TABELLE VI.
Einfluss von HCl auf die Urikasewirkung.

No.	Urikase Menge ccm	HCl Konzentration ccm Menge		Borat-Puffer (9.3) ccm	Zugesetzte Harnsäure mg	Zersetzte Harnsäure mg
		Normal	ccm			
1	3	$\frac{1}{20}$	1	4	1.68	0
2	3	$\frac{1}{40}$	1	4	"	0.52
3	6	$\frac{1}{80}$	1	4	"	0.86
4	3	$\frac{1}{160}$	1	4	"	0.86
Kon- trolle	3	0	0	6	"	0.86
Nach 30 Min. durch NaOH d. gleichen Konzentr. neutralis.				60 Min. bei 45°C.		

mung der Ph ergab bei 3 cem Urikase plus n/20 Salzsäure Ph 2.3 und Urikase 3 cem plus n/80 Salzsäure 1 cem Ph 7.2).

Wenn der Urikase-Lösung 1 cem n/40 Salzsäure tropfenweise zugefügt wird, dann erreicht die Ph 7.2, und das Eiweiss fällt am stärksten aus, wenn die Ph nach der Säureseite neigt; später wird der Niederschlag wieder aufgelöst. Bei Ph 2.3 ist eine Wirkung der Urikase nicht mehr möglich.

Die Wirkung der Schwefelsäure auf die Urikase-Lösung ist genau dieselbe wie die der Salzsäure.

Der Einfluss der Essigsäure auf die Urikase-Lösung.—Wenn man zu 3 cem einer Urikase-Lösung tropfenweise n/50 Essigsäure hinzufügt, dann fällt bei Hinzufügen von ca. 1.5 cem ein deutlicher Niederschlag aus. Nach 30 Minuten wird zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit ebenso wie der Bodensatz (in 0.1%iger Natriumkarbonatlösung gelöst) untersucht. Die Untersuchung der Fermentwirkung der überstehenden Flüssigkeit fällt negativ aus, während der Bodensatz eine der originalen Flüssigkeit ganz gleiche Wirkungskraft zeigt. Es geht aus diesem Versuch hervor, dass der wirksame Bestandteil der Urikase durch die Essigsäure mit dem Eiweiss völlig ausgefällt wird.

6. *Einfluss von Alkohol und Äther auf die Wirkung der Urikase.*—Es lag mir bei diesen Untersuchungen daran festzustellen, ob Alkohol und Äther die Wirkung der Urikase vernichten oder nicht. Zu diesen Untersuchungen habe ich der Urikase-Lösung Alkohol und Äther in verschiedenen Volumverhältnissen hinzugefügt, nach 30 Minuten den Alkohol oder Äther abgedampft (im Wasserbade bei 40°C), Harnsäure zugesetzt und gefunden, dass Alkohol oder Äther schon in einer Konzentration von 12% die Wirkung der Urikase auffallend abschwächen. Wie die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die in Tabelle VII wiedergegeben sind, zeigen, ist es sehr wichtig, bei der Darstellung der Urikase die Behandlung mit Alkohol und Äther möglichst schnell durchzuführen.

7. *Einfluss von Cyankalium und Schwermetall-Salzen auf*

TABELLE VII.

Einfluss von Alkohol und Äther auf die Urikasewirkung.

60 Minuten bei 45° C.

No.	Urikase-Lös. cem	Alkohol (95%) cem	Aether cem	Zugesetzte Harnsäure mg	Zersetzte Harnsäure mg
1	2	0.5	0	1.68	0.28
2	2	1.0	0	"	0.15
3	2	1.5	0	"	0.15
1	2	0	0.5	"	0.28
2	2	0	1.0	"	0.22
8	2	0	1.5	"	0.22
Kon- trolle	2	0	0	"	0.56

die Urikase-Wirkung.—Es ist bekannt, dass das Cyankalium auf die Wirkung der Oxydase, besonders der Schwermetall-Katalyse, in auffallender Weise hemmend wirkt. Sein Einfluss auf die Wirkung der Urikase ergibt sich aus der Tabelle VIII. Daraus ist zu ersehen, dass das Cyankalium die Wirkung der Urikase schon bei einer Konzentration von m/100,000 in auffallender Weise hemmt. Von anderen Salzen habe ich Ammonchlorid, Kochsalz, Magnesiumchlorid, Bariumchlorid, Kaliumchlorid und Calciumchlorid in verschiedener Konzentration der Urikase zugesetzt, doch habe ich keinerlei Einfluss derselben auf die Urikase-Wirkung feststellen können. Ammonchlorid hat an sich eine Harnsäure spaltende Wirkung. Ich habe beobachtet, dass 1 cem 10%iges Ammonchlorid innerhalb einer Stunde 0.38 mg Harnsäure spaltet. Diese Wirkung des Ammoniaks ist schon von Schittenhelm und Chrometzka (1927) beobachtet worden, dass nämlich bezüglich der Urikase-wirkung kein gegenseitiger Einfluss besteht.

Als Schwermetall-Salze wurden Kupfer- und Eisensalze untersucht, doch habe ich keinerlei Einfluss auf die Urikase-Wirkung

TABELLE VIII.
Einfluss von KCN auf die Urikasewirkung.
60 Min. bei 45°C.

Nr.	KCN Kon- zent.	KCN Menge ccm	Urikase Menge ccm	Borat- Puffer. (9.3) ccm	Zugesetzte Harnsäure mg	Zersetzte Harnsäure mg
1	$\frac{M}{.1}$	1	3	6	1.68	0
2	$\frac{M}{10}$	1	3	6	"	0.26
3	$\frac{M}{100}$	1	3	6	"	0.34
4	$\frac{M}{1000}$	1	3	6	"	0.39
5	$\frac{M}{10000}$	1	3	6	"	0.40
6	$\frac{M}{100000}$	1	3	6	"	0.52
Kon- trolle	0	0	3	7	"	0.63

feststellen können. Ebenso blieb auch ein Zusatz von Platinkolloid, Goldkolloid und Kupferkolloid, hergestellt nach Bredig, ohne jeglichen sichtbaren Einfluss auf die Urikase-Lösung.

8. *Einfluss der Röntgenstrahlen und ultravioletten Strahlen auf die Urikase-Lösung.*—Ich habe 6 ccm Urikase-Lösung mit Röntgenstrahlen von verschiedener Wellenlänge (0.132\AA , 0.096\AA und 0.074\AA) in einer Dosis von je 40 r bestrahlt und die urikolytische Wirkung untersucht, habe jedoch gegenüber der Originallösung keinerlei Unterschied feststellen können.

Ebenso hatte auch die Bestrahlung mit ultravioletten Strahlen auf 30 cm Distanz während 5 Minuten keinerlei Wirkung auf die urikolytische Wirkung der ursprünglichen Lösung.

9. *Einfluss von Sauerstoff und Wasserstoffsuperoxyd auf die Urikase-Wirkung.*—Während eine Theorie besagt, dass zur Urikase-

Wirkung die Gegenwart von Sauerstoff nötig ist, besagt eine andere, dass die Urikase auch in sauerstofffreien Medien langsam wirke. Ich bin aber der Ansicht, dass im allgemeinen das Vorhandensein von Sauerstoff nötig ist. Ich habe deshalb der Urikase-Lösung im Vakuum 24 Stunden lang die Luft entzogen, dann Harnsäure zugesetzt und 1 Stunde bei 45°C stehen lassen, und gefunden, dass die Urikase völlig wirkungslos blieb. Wenn aber dieser Lösung dann Luft zugeleitet, und wieder 1 Stunde bei 45°C stehen gelassen wurde, dann wurde völlige Spaltung der Harnsäure festgestellt. Daraus ergibt sich also, dass die Urikase zu ihrer Wirkung unbedingt des Sauerstoffs bedarf.

Weiter habe ich untersucht, ob nicht ein Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd die Urikase-Wirkung beschleunigt. Battelli und Stern (1909) haben beobachtet, dass Äthylhydroperoxyd die Wirkung der Urikase nicht beschleunige, dagegen Oxyhämoglobin eine deutlich verstärkende Wirkung habe. Chrometzka (1927) hat festgestellt, dass Wasserstoffsuperoxyd allein eine die Harnsäure spaltende Wirkung habe.

Ich habe zuerst das Wasserstoffsuperoxyd allein auf die Harnsäure wirken lassen und gefunden, dass 1 ccm einer m/10 Wasserstoffsuperoxyd-Lösung 0.4 mg Harnsäure in 30 Minuten zu spalten vermag. Dann habe ich der originalen Urikase-Lösung, oder solcher, deren Fermentwirkung durch Kochen beseitigt wurde, Wasserstoffsuperoxyd und Harnsäure zugesetzt, weiter auch zu Rinderleberextrakt, Menschennierenextrakt und Menschenleberextrakt Wasserstoffsuperoxyd und Harnsäure zugefügt, 30 Minuten bei 45°C erwärmt, und danach die mit den einzelnen Lösungen erhaltenen Ergebnisse verglichen. Es ergab sich dass bei Hinzufügen von 1 ccm m/10 Wasserstoffsuperoxyd-Lösung zu 3 ccm Urikase-Lösung im Vergleich zu der Wirkung des Wasserstoffsuperoxyd bzw. der Urikase-Lösung allein, eine auffallend aktivierte Spaltung beobachtet wurde; wenn aber die Urikase gekocht oder ihr Säure zugesetzt wird, sodass sie inaktiv wird, und man dann Wasserstoffsuperoxyd zusetzt, so wird nur die dem letzteren

entsprechende Harnsäure-Menge gespalten. Das heisst also in der Urikase-Lösung wird das Wasserstoffsuperoxyd durch Peroxidase gespalten unter Bildung von aktivem Sauerstoff, welcher die Harnsäure oxydieren kann. In den Menschen- Leber- und Nieren-extrakten ist aber keine solche Peroxydase vorhanden; die Harnsäure wird also nicht gespalten, wenn auch H_2O_2 von in dem Präparat vorhandener Katalase gespalten wird.

10. *Einfluss von proteolytischen Fermenten auf die Wirkung der Urikase.*—Da die von mir hergestellte Urikase-Lösung noch Eiweiss enthält, so habe ich auf dieselbe Trypsin einwirken lassen und den Einfluss dieser Behandlung auf die Wirkung der Urikase beobachtet. Zunächst habe ich festgestellt, dass in 100 cem Urikase-Lösung an sich schon 8.4 mg Aminosäuren vorhanden sind. Darauf habe ich auf 100 cem Urikase-Lösung 0.1 g Trypsinpulver zugesetzt und gefunden, dass nach 3 Stunden die Aminosäuren um 4.4 mg, nach 24 Stunden um 7.0 mg zunahmen. Das bedeutet also, dass das Eiweiss in der Urikase-Lösung durch das Trypsin zu Aminosäuren verdaut wird. Darauf habe ich Harnsäure zugesetzt und festgestellt, dass die urikolytische Wirkung der Lösung im Vergleich zur ursprünglichen Lösung nicht abgenommen hat.

11. *Einfluss des Nieren- bzw. Leberextrakts vom Menschen, von Rinderleber-Extrakt und Kaninchen-Nierenbrei auf die Wirkung der Urikase.*—(Antiferment-Frage). Batelli und Stern haben beobachtet, dass in der menschlichen Leber und Niere, sowie in der Rinderleber eine die Urikase-Wirkung hemmende Substanz vorhanden ist, und glauben deshalb nicht recht an eine Urikase-wirkung. Verf. hat ebenfalls beobachtet, dass in der menschlichen Leber und Niere, der Rinderniere und der Kaninchenniere keine Urikase vorhanden ist. Um nun festzustellen, ob tatsächlich in diesen Organen eine die Urikasewirkung hemmende Substanz vorhanden ist oder nicht, habe ich die genannten Extrakte der Urikase-Lösung zugesetzt und festgestellt, dass eine die Urikasewirkung hemmende Substanz nicht vorhanden ist. Auch bei Durchbluten der Kaninchenniere mit Kochsalzlösung bis zur Blutleere, Herstel-

lung eines Breis derselben und Zusatz von Urikase-Lösung ist das Vorhandensein einer die Urikasewirkung hemmenden Substanz nicht festzustellen.

Ferner habe ich versucht, ob Antifermentkörper gegen Urikase entstehen oder nicht. Zunächst wurde als Vorversuch Urikase dem Normalserum von Kaninchen zugesetzt und dabei gefunden, dass dadurch die Wirkung unverändert bleibt. Auch habe ich festgestellt, dass Kaninchen-Serum für sich allein die Harnsäure nicht zu spalten vermag.

Ich habe dann einem Kaninchen von 2,700 g Körpergewicht in Intervallen von 5 Tagen zunächst 1 ccm, dann 1.5 ccm und schliesslich 2 ccm Urikase-Lösung intravenös injiziert und nach 17 Tagen das Serum entnommen. Diesem wurde in verschiedenem Verdünnungsgrade Urikase-Lösung zugesetzt, und das Ganze 18 Stunden lang im Brutschrank stehen gelassen. Wie die Tabelle IX zeigt, wurde ein Niederschlag ausgeschieden.

TABELLE IX.
Immun-Serum-Einfluss auf Urikase-Lösung.
18 St. auf Brutschrank.

No.	Verdünnungsgrad des Serums:	Original- Lös.	2×	4×	8×	16×	32×	64×	128×
1	Serummenge	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
2	Urikaselösung	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm	1 ccm
3	Präzipitation	##	##	##	##	+	+	gering ge- trübt.	0

Weiter habe ich dann dem Serum in verschiedener Verdünnung Harnsäure zugesetzt und gefunden, dass die urikolytische Wirkung gegenüber der der Kontrolle unverändert war.

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass im Kaninchen-Serum

Präzipitin für das Eiweiss der Urikase-Lösung auftritt, dass aber ein Antiferment dabei nicht entsteht.

IV. REAKTIONSKINETIK DER URIKASE-LÖSUNG UND REAKTIONSPRODUKTE.

Die Reaktionskinetik der Urikase wurde bereits von vielen Forschern untersucht, doch wurden dazu die Ferment-Präparate leider nicht im gelösten Zustand angewendet. Daher habe ich noch einmal dieselben Untersuchungen mit meiner aktiven und homogenen Fermentlösung ausgeführt.

4 ccm Urikase-Lösung spalten 1.68 mg Harnsäure innerhalb 2 Stunden vollständig. Die Fermentmenge und die gespaltene Harnsäuremenge sind einander proportional, aber die Fermentmenge und die Reaktionsgeschwindigkeit sind einander entgegengesetzt proportional. Wenn man zu 4 ccm Urikaselösung 1.68 mg Harnsäure hinzugibt und nach deren völliger Spaltung nochmals die gleiche Menge Harnsäure hinzufügt und darauf erwärmt, so wird zwar die Reaktionsgeschwindigkeit eine etwas geringere sein, aber die Harnsäure doch vollständig gespalten werden.

Weiter habe ich zu 3 ccm Urikaselösung 1 ccm m/100 Harnsäurelösung und 6 ccm (Ph 9.3) Boratpuffer hinzugesetzt, auf 45°C erhitzt und die oxydierte Harnsäuremenge alle 10 Minuten bestimmt.

Die Tabelle X gibt die Ergebnisse dieser Untersuchungen wider. Danach entspricht die Form der Reaktionsgeschwindigkeit der monomolekularen Reaktion fast annähernd, aber noch genauer der Schütz'schen Regel.

Ich habe weiter festzustellen gesucht, ob durch Wirkung der Urikase die durch Oxydation der Harnsäure gebildete Allantoin-Menge der Menge der zersetzten Harnsäure entspricht oder nicht.

Zu diesem Zwecke habe ich der Urikase-Lösung eine bestimmte Menge Harnsäure zugefügt. Darauf habe ich vermittels der Handovsky-schen Titrationsmethode (1917) die Menge der oxydierten Harnsäure und des gebildeten Allantoins festgestellt und

TABELLE X.

Reaktionsgemisch:

Urikase 3 ccm + Harnsäure 1.68 mg + Borat-Puffer (9.3 6 ccm

Zeit (Minuten)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
Zersetzte Harnsäure- menge in mg	0.36	0.56	0.73	0.88	0.98	1.10	1.19	1.26	1.33	1.43	1.50	1.57	1.64
$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} \times 10$	1.0	0.8	0.8	0.8	0.75	0.75	0.75	0.73	0.74	0.8	0.85	0.9	1.0
$K = \frac{\bar{X}}{t} \times 1000$	0.12	0.13	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.14	0.15

TABELLE XI.

No.	Reaktions- stunden	Harnsäure-Menge:		Allantoin-Menge:			
		Zugesetzt:	Gespalten:	Gefunden:	Berechnet:	Differenz:	%
I	1	20 mg	5.20 mg	4.79 mg	5.12 mg	0.33 mg	7
II	2	20 mg	9.50 mg	7.73 mg	9.42 mg	1.69 mg	15

beide verglichen. Ich habe zu 30 cem Urikaselösung 0.02 g Harnsäure und 20 cem Boratpuffer (Ph 9.3) hinzugegeben und 1–2 Stunden bei 45°C stehen lassen. Die Resultate sind in der Tabelle XI angegeben.

Es wird also in der Tat durch die Zersetzung die ideale Allantoin-Menge nicht gebildet. Aber die Differenz von 7–15% wird bei dieser Mikromethode auf technische Fehler zurückzuführen sein. Daher scheint es mir sehr wahrscheinlich, dass die Urikase die Harnsäure vollständig in die entsprechende Allantoin-Menge umwandelt.

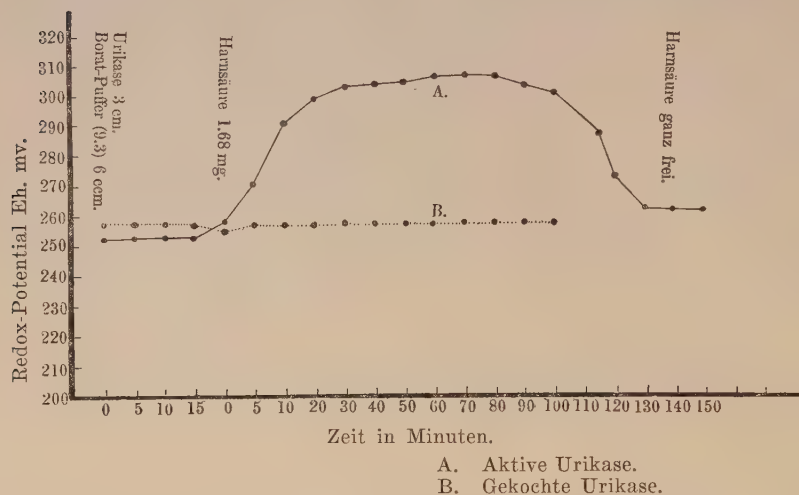
V. DAS REDOX-POTENTIAL DER URIKASE PLUS HARNSÄURE-LÖSUNG.

Für die Bestimmung des Redox-Potentials wurde der Apparat von Dr. K. Kodama (1929) mit Platinelektrode angewandt. Ich habe beobachtet, dass wenn die Urikase-Harnsäure-Lösung an der Luft auf 45°C erwärmt und das Redox-Potential von Zeit zu Zeit bestimmt wird, dieses nur während der Zeit, während welcher die Harnsäure oxydiert wird, ansteigt, jedoch wieder abfällt, sobald die ganze Harnsäure-Menge zersetzt ist. (Figur 3). Weiter habe ich beobachtet, dass in der Allantoin-Lösung allein das Potential nicht ansteigt.

Denselben Versuch habe ich dann im Vakuum und im Stickstoff-Medium wiederholt und festgestellt, dass in diesen Fällen das Potential nicht ansteigt. Ebenso steigt das Potential auch dann nicht an, wenn das Ferment durch Kochen der Urikase-Lösung abgetötet, und danach Harnsäure zugesetzt wurde. (Figur 3).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Versuche lässt uns darauf schließen, dass wenn die Urikase die Harnsäure zu Allantoin oxydiert, eine intermediäre Substanz gebildet wird, die das Redox-Potential ansteigen lässt. Was für eine Substanz dabei entsteht, kann ich jetzt nicht entscheiden. Ein Versuch, dabei mit Titanreagens Wasserstoffsuperoxyd nachzuweisen, fiel negativ aus. Auch die Hinzufügung von aktiver Katalase, hergestellt aus

Fig. 3. Redox-Potential der Urikase plus Harnsäure und Borat-Puffer.



Pferdeblut, um H_2O_2 zu spalten, wenn es gebildet wurde, hat keinen Einfluss ausgeübt.

VI. OXYDATION DER HARNSÄURE MITTELS SCHWERMETALL-KATALYSE.

Dass bei einem Überschuss von Kupfersulfat, wenn man eine alkalische Harnsäure-Lösung mit Kupfersulfat-Lösung kocht, die Harnsäure gespalten wird, ist bekannt, darüber aber, wie diese Reaktion ausfällt, wenn man sie bei niedrigen Temperaturen vor sich gehen lässt, fand ich in der Literatur keine Angaben. Ich habe deshalb diesbezügliche Versuche ausgeführt und weiter festzustellen versucht, ob der Kupfergehalt in der Urikase-Lösung für deren urikolytische Wirkung von irgendwelcher nennenswerten Bedeutung ist.

Zu 1 ccm einer m/100 Kupfersulfat-Lösung (als Cu berechnet 0.6357 mg) habe ich 1 ccm m/100 Harnsäure (1.68 mg) hinzugefügt, sauer oder alkalisch reguliert, und bei 38°C 30 Minuten lang erwärmt. Danach wurde die gespaltene Harnsäure-Menge

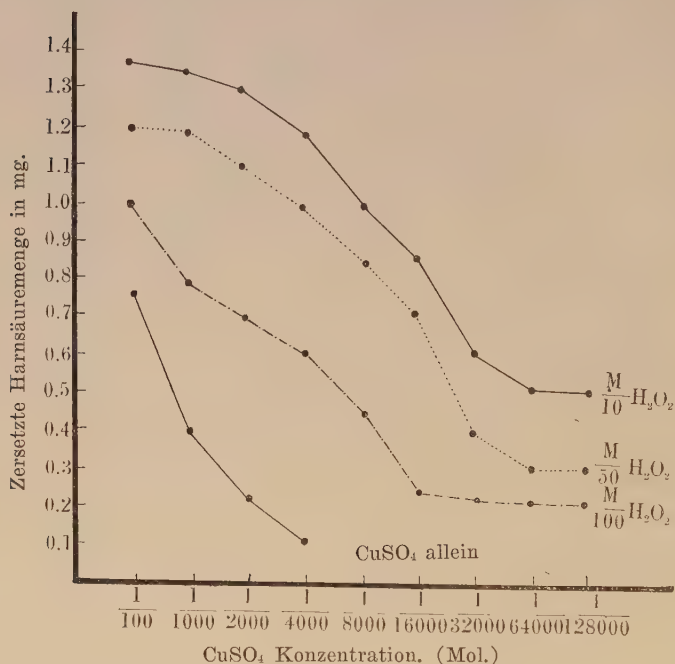
bestimmt. Wie die Figur 4 zeigt, hat 1 ccm m/100 Kupfersulfatlösung in einem schwach alkalischen Medium die Fähigkeit 0.746 mg Harnsäure zu spalten. Sodann habe ich zu verschiedenen Mengen Kupfersulfat-Lösung bestimmte Mengen Harnsäure zugesetzt, auf 38°C erwärmt und die Menge der gespaltenen Harnsäure bestimmt. Wie Figur 4 zeigt, kann 1 ccm einer m/4,000 Kupfersulfat-Lösung 0.13 mg Harnsäure spalten; dagegen ist eine m/8000 Kupfersulfat-Lösung gänzlich wirkungslos.

Weiter habe ich festzustellen gesucht, ob ebenso wie bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd die urikolytische Wirkung der Urikase-Lösung gefördert wird, auch die Wirkung der Kupfersulfatlösung durch Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd gefördert werden kann. Zu diesem Zwecke habe ich zunächst als Vorversuch Wasserstoffsuperoxyd in verschiedenen Konzentrationen der Harnsäure hinzugefügt, bei 38°C während 30 Minuten erwärmt und dann die urikolytische Wirkung bestimmt. Figur 5. Wie Figur 5 zeigt, hat 1 ccm einer m/160 Wasserstoffsuperoxydlösung noch die Kraft 0.08 mg Harnsäure zu spalten, während eine m/320 Lösung in einer Menge von 1 ccm völlig wirkungslos ist.

Darauf habe ich zu 1 ccm Kupfersulfatlösung verschiedener Konzentration je 1 ccm m/10, m/50 oder m/100 Wasserstoffsuperoxyd-Lösung hinzugefügt, diese Lösung auf 1.680 mg Harnsäure bei 38°C 30 Minuten einwirken lassen und dann die urikolytische Wirkung bestimmt. (Figur 4). Weiter habe ich zu je 1 ccm Wasserstoffsuperoxyd-Lösungen verschiedener Konzentration je 1 ccm einer m/5000 Kupfersulfatlösung und 1.680 mg Harnsäure hinzugesetzt, bei 38°C 30 Minuten lang erwärmt und die gespaltene Harnsäure-Menge bestimmt. (Figur 5). Wie Figur 5 zeigt, haben das Wasserstoffsuperoxyd und das Kupfersulfat gemeinsam eine stärker spaltende Wirkung auf die Harnsäure als jedes dieser Reagentien für sich allein.

Fassen wir die Ergebnisse der obigen Versuche zusammen, so ist zu folgern, dass das Kupfer das Wasserstoffsuperoxyd spaltet, dass hierdurch aktiver Sauerstoff produziert und die Oxydation der

Fig. 4. Spaltung der Harnsäure durch Kupfersulfatlösung von verschiedener Konzentration und Wasserstoffsperoxyd.

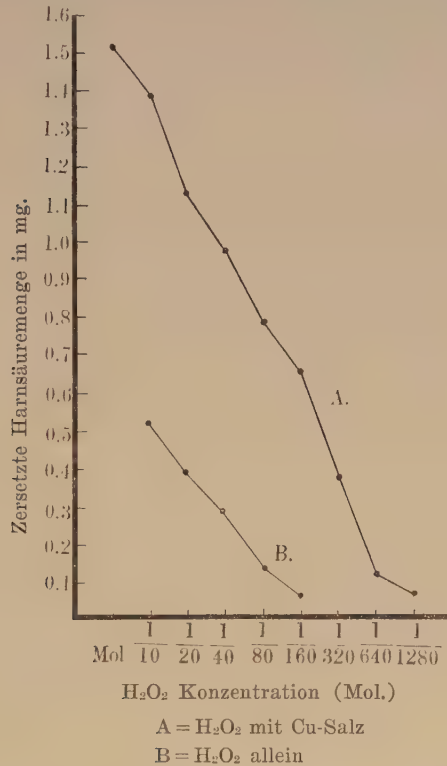


Harnsäure befördert wird. Davon wieder ist wohl abzuleiten, dass das in der Urikase-Lösung vorhandene Kupfer für deren urikolytische Wirkung eine gewisse Bedeutung hat.

Ein Hinzufügen von Eialbumin, Adrenalin, p-Kresol, Phenol, Pyridin, Acetaldehyd oder Cyankalium zu der Kupfersulfatlösung oder der Kupfersulfat-Wasserstoffsperoxyd-Kombination ist von keinerlei Einfluss auf die urikolytische Wirkung derselben. Das Verhalten von Cyankalium ist besonders beachtenswert, weil es die Aktivität der Urikase völlig hemmt.

Nickelsulfat, Vanadiumchlorid, Titantrichlorid, Platinkolloid, Goldkolloid und Eisensalze haben auf den urikolytischen Vorgang absolut keine Wirkung. Ebenso kommt ihnen auch die Eigenschaft

Fig. 5. Einfluss der Konzentration von H_2O_2 auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Harnsäure durch Kupfersulfatlösung (M/5000).



Wasserstoffsuperoxyd in der Weise der Peroxydase zu spalten und den Sauerstoff zu aktivieren nicht zu.

Manganchlorid-Lösung vermag Harnsäure nicht zu spalten; dagegen habe ich aber beobachtet, dass dieses Reagens das Wasserstoffsuperoxyd spaltet, den Sauerstoff aktiviert und so die urikolytischen Vorgänge leicht befördert.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Ich habe eine neue Methode der Urikase-Darstellung aus Rinder-Niere beschrieben.

2. Die Urikase ist in dem Gewebe der Rinderniere am reichlichsten vorhanden, dagegen ist sie in der Rinderleber und in den Geweben der menschlichen Organe nie festzustellen.

3. Die Urikase ist eine auf die Harnsäure spezifisch wirkende Oxydase und wirkt nicht auf Hypoxanthin und Xanthin. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Urikase entspricht fast völlig der Schützschens Reaktionsformel.

4. Der wirksame Bestandteil der Urikase wird durch gesättigte Ammonsulfat-Lösung oder Essigsäure mit dem Eiweiss ausgefällt.

5. Der wirksame Bestandteil des Urikase-Pulvers wird am besten in einer alkalischen Lösung von Ph 9.4 extrahiert, in sauren Lösungen von über Ph 7.5 ist er nicht extrahierbar.

6. Die Urikase zerfällt in Säuren von Ph 2.3 oder Basen von Ph 11.2 innerhalb 30 Minuten vollständig.

7. Das Ph-Optimum für die Urikase-Wirkung liegt bei 9.4, sie wirkt zwischen Ph 7.5–10.7.

8. Das Temperatur-Optimum für die Urikase-Wirkung beträgt 45°C. Bei 70°C während 15 Minuten erhitzt, zerfällt sie völlig.

9. In 12%igem Alkohol oder Äther wird die Wirkung der Urikase deutlich abgeschwächt.

10. Durch Cyankalium-Lösung wird die Wirkung der Urikase deutlich abgeschwächt.

11. Zur Entfaltung der Wirkung der Urikase ist unbedingt Sauerstoff notwendig; im Stickstoff-Medium oder im Vakuum bleibt sie völlig wirkungslos.

12. In der Urikase ist Peroxydase vorhanden, die den Sauerstoff des Wasserstoffsuperoxyds aktiviert.

13. Wenn die Urikase die Harnsäure oxydiert, steigt das

Redox-Potential an. Ich nehme deshalb an, dass zunächst eine intermediäre Substanz von hohem Oxydationspotential und dann Allantoin entsteht.

14. Selbst bei Injektion von Urikase in Kaninchen entsteht im Serum kein Antifermentkörper.

15. Kupfersulfat-Lösung und Kupferkolloid-Lösung haben eine die Harnsäure spaltende Wirkung; weiter haben sie auch die Fähigkeit Wasserstoffsuperoxyd zu spalten, den Sauerstoff zu aktivieren und so die Urikolyse deutlich zu fördern.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis meinen hochverehrten Lehrern, den Herren Prof. Dr. K. Kodama für Anregung und Leitung bei dieser Arbeit und Prof. Dr. R. Kaneko für das meinen Untersuchungen entgegengebrachte Interesse und manchen guten Rat meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Battelli und Stern (1909): Biochem. Zeitschr., **19**, 219.
Battelli und Stern (1908): Biochem. Zeitschr., **13**, 44.
Battelli und Stern (1914): Biochem. Zeitschr., **67**, 465.
Bruning und Einecke, Betero (1928): Zeitschr. f. physiol. Chem., **174**, 94.
Biltz, H. und Max (1921): Ber., **54**, 2451.
Claus. Ad. (1874): Ber., **54**, 2451.
Croftan (1908): Pflügers Archiv., **121**, 377.
Chrometzke (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **162**, 203.
Dixon und Thurlow (1925): Biochem. Journal., **19**, 672.
Felix und Scheel (1929): Verhandl. d. Gesell. f. inn. Med., **109**,
Galeotti, G. (1911): Biochem. Zeitschr., **30**, 374.
Gomolinska (1929): Biochem. Journal., **22**, 1307.
Hoppe-Seyler (1905): Zeitschr. f. physiol. Chem., **45**, 62.
Heinrich Biltz und R. Pohl (1920): Beiträge d. chem. Gesell., **53**,
1959.
Jastrowitz (1919): Biochem. Zeitschr., **94**, 332.
Lichtwitz (1926): Zeitschr. f. klin. Med., **140**, 1-5.
Néme (1920): Biochem. Zeitschr., **112**, 286.
Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen.
Ohta, K. (1913): Biochem. Zeitschr., **34**, 439.

- Przylecki (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **178**, 19.
Przylecki (1928): Biochem. Journal, **22**, 1026.
Przylecki (1928): Compt. rend. scie. biol., **98**, 1026.
Strakenstein (1920): Biochem. Zeitschr., **106**, 157.
Steudel und Izumi, S. (1923): Zeitschr. f. physiol. Chem., **129**, 188.
Schittenhelm und Chrometzka (1927): Zeitschr. f. physiol. Chem., **162**, 188.
Schittenhelm und Warnat (1928): Zeitschr. f. physiol. Chem., **171**, 174.
Thannhauser, Lurz und Gara (1926): Zeitschr. f. physiol. Chem., **156**, 251.
Warburg (1922): Biochem. Zeitschr., **136**, 266.
Warburg (1922): Biochem. Zeitschr., **142**, 518.
Warburg (1925): Biochem. Zeitschr., **163**, 252.
Warburg (1925): Biochem. Zeitschr., **163**, 250.
Wiechowski und Wiener (1907): Beiträge zur chem. Physiol. u. Path., **9**, 247.
Wiener (1905): Zeitschr. f. physiol. Chem., **18**, 22.

ÜBER DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES ALLANTOINS AUF KOLORIMETRISCHEM WEGE.

VON

KISHUN RO.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)*

(Eingegangen am 5. Juni 1931)

Die Farbenreaktion des Allantoins ist schon von mehreren Forschern eingehend untersucht worden. Asche hat 1910 zuerst festgestellt, dass das Allantoin mit Pepton und konzentrierter Schwefelsäure violette Farbenreaktion zeigt. Er fand weiter, dass diese Reaktion nicht spezifisch ist, sondern dass sie auch für Kreatin, Tryptophan, Eiweiss und verschiedene Aldehyde in gleicher Weise ausfällt. Schiff (1910) fand, dass bei Zusatz von rauchender Salzsäure und Naphtoresorcin zu Allantoin und darauffolgendem Schütteln mit Äther letzterer sich blau verfärbt. Der Harnstoff aber reagiert in derselben Weise. Fosse und Bossyt (1929) haben als Eigentümlichkeit des Allantoins und zum mikroskopischen Nachweis desselben die nachstehenden Eigentümlichkeiten gefunden, auf denen sie ihre Methode begründeten: Sie kochten das Allantoin mit Kalilauge und führten dann mit Säure Hydrolyse herbei, wodurch zuerst Allantoinsäure, und danach aus dieser 2 Mol Harnstoff und 1 Mol Glyoxylsäure entstanden. Die letztere haben sie durch die Phenylhydrazin-Reaktion nachgewiesen. Der Nachweis wird so geführt, dass man zu 1 ccm Allantoinlösung 1 Tropfen 2N-Kalilauge hinzufügt, 5 Minuten auf dem Wasserbade erhitzt, Phenolphthalein als Indikator zusetzt, mit N-Salzsäure neutralisiert und darüber noch 1 Tropfen N-Salzsäure in Überschuss zugibt, dann noch einmal 1 Minute kocht, 4 Tropfen 1%iger Phenylhydrazinhydrochlorat-Lösung und

1.5 ccm rauchende Salzsäure hinzufügt, worauf Rotfärbung eintritt. Diese Reaktion ist sehr empfindlich; das Allantoin ist noch in 1 ccm einer Lösung von 0.01 g in 1 l Wasser nachweisbar.

Ich habe die obengenannten Verfahren nachgeprüft und versucht das Allantoin kolorimetrisch auch quantitativ nachzuweisen. Dabei habe ich festzustellen gesucht, ob die durch Hydrolyse entstehende Glyoxylsäure-Menge dem Grade der Verfärbung proportional ist oder nicht, und welchen Einfluss verschiedene Substanzen auf diese Reaktion haben.

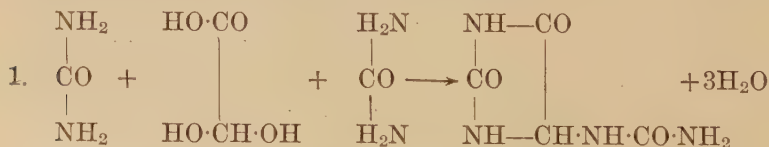
Die Asche'sche Reaktion ist nicht nur nicht spezifisch, sondern es ist auch der Grad der Verfärbung nicht proportional dem Allantoin-Gehalt; und da der Farbenton violett—blaurot—gelb ist und auch aus den Übergängen dieser Farben besteht, ist eine kolorimetrische quantitative Bestimmung des Allantoins ausgeschlossen.

Die Schiff'sche ist unbrauchbar, da der Färbungsgrad unsicher ausfällt, und ausserdem der Harnstoff dieselbe Reaktion ergibt.

Bei der Reaktion von Fosse und Bossyt entspricht der Färbungsgrad fast genau der Allantoin-Menge, aber es zeigt sich, dass wenn bei der Originalmethode die Allantoin-Menge sehr klein wird, der Farbenton mehr und mehr ins Gelbe übergeht. Es ist deshalb ein genauer kolorimetrischer Vergleich nicht möglich.

Das Prinzip der letztgenannten Methode habe ich meinen Untersuchungen zugrunde gelegt und diese auf alle mögliche Art und Weise so zu modifizieren versucht, dass eine quantitative kolorimetrische Bestimmung möglich wird.

Allantoin ist eine Verbindung von 1 Mol Glyoxylsäure und 2 Mol Harnstoff. Der Aufbau ist der folgende:

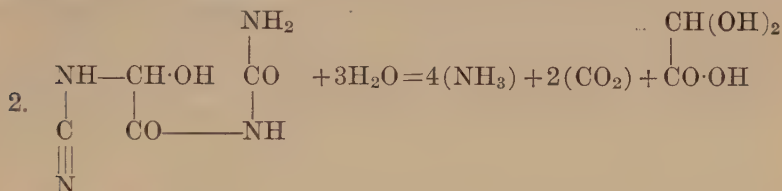


Wenn man das Allantoin mit Alkali kocht, dann wird es in

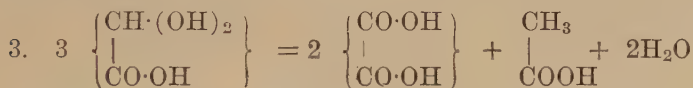
Harnstoff und Glyoxylsäure gespalten.

Claus hat gefunden, dass bei Kochen des Allantoins mit konzentrierten Alkalien der Cyanamid- und Harnstoffrest in Kohlensäure und Ammoniak übergeht; und wenn dann in den $-\text{CH}\cdot\text{OH}-$ Rest 2(OH) eingeführt werden, so erhält man Glyoxyl-

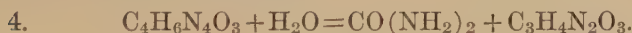
säure nach der folgenden Gleichung:



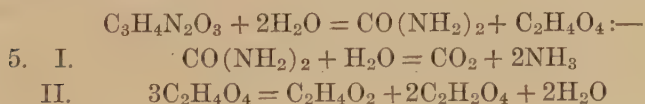
Diese Glyoxylsäure kann in alkalischer Lösung nicht bestehen, sondern zerfällt sofort in Oxalsäure und Essigsäure wie die folgende Gleichung zeigt:



Wenn man Allantoin mit Salpetersäure oder Bleisuperoxyd erhitzt, oder mit Wasser auf 110–140°C erhitzt, dann zerfällt es in Harnstoff und Allantursäure (Glyoxylharnstoff) wie die nachstehende Gleichung zeigt:



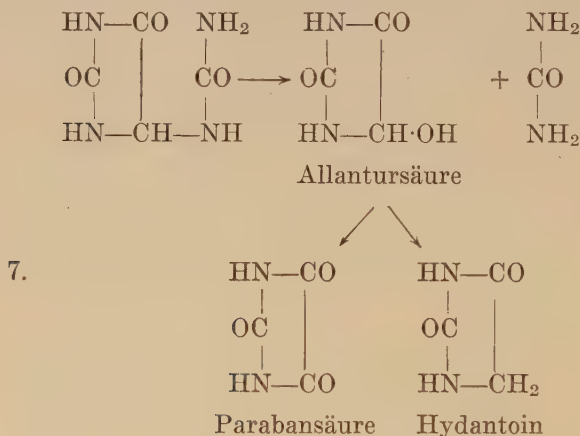
Die gleiche Spaltung erfolgt auch durch Zusatz und Kochen mit Alkali. Die entstehende Allantursäure wird in Glyoxylsäure und Harnstoff zersetzt, und weiter zerfällt durch die Wirkung des Alkali der Harnstoff in Kohlensäure und Ammoniak und die Glyoxylsäure in Essigsäure und Oxalsäure, wie die nachstehende Gleichung zeigt:



Umgekehrt wird durch Kochen von 1 Mol Glyoxylsäure und 2 Mol Harnstoff bei 100°C während 10 Stunden wiederum Allantoin nach der folgenden Gleichung gebildet:



Nach Christman entsteht durch Alkalihydrolyse des Allantoins zunächst Allantursäure und dann Parabansäure und Hydantoin. Die Parabansäure zerfällt wieder in Oxalsäure und Harnstoff, und es entsteht daher aus 2 Mol Allantoin 1 Mol Oxalsäure. Christman hat daher vorgeschlagen, die Oxalsäure als Kaliumoxalat auszufällen und mit Kaliumpermanganat-Normallösung zu titrieren und so das Allantoin indirekt quantitativ zu bestimmen, wie es in der folgenden Gleichung wiedergegeben ist:



Auf diese Weise zerfällt das Allantoin je nach den Bedingungen des Mediums in verschiedene Spaltungsprodukte. Ich habe nun festzustellen gesucht, auf welche ideale Weise das Allantoin in Allantoinsäure und weiter vollständig in Glyoxylsäure überführt werden kann, und wie die Glyoxylsäure durch Zusatz von Reagentien eine genügend scharfe Farbenreaktion ergeben kann, um auf diesem Wege durch den Vergleich mit der Färbung einer bekannten

Menge Glyoxylsäure auf indirektem Wege das Allantoin quantitativ bestimmen zu können.

I. ALKALIHYDROLYSE DES ALLANTOINS.

Es lag mir zunächst daran, durch Hydrolyse einer bekannten Menge Allantoin eine bequeme Art und Konzentration des Alkalis zur Überführung des ersteren in Allantoinensäure ausfindig zu machen.

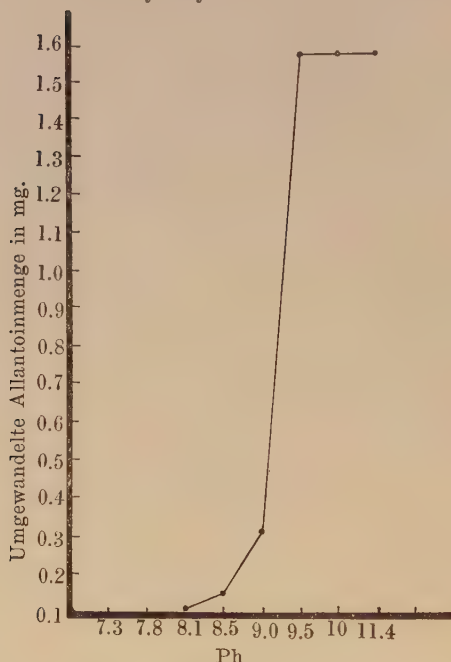
Fosse und Bossyt haben zu 1 ccm Allantoin-Lösung 2N-Kalilauge 1 Tropfen zugesetzt und 5 Minuten gekocht. Ich habe zu 1 ccm einer m/100 Allantoin-Lösung Kalilauge oder Natronlauge oder Natriumkarbonat in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt und während bestimmter Zeit gekocht, um dabei festzustellen, bei welchem Optimum der Ph eine vollständige Überführung in Allantoinensäure vor sich geht.

Bei diesen Versuchen habe ich festgestellt, dass bei Anwendung der Alkalien in gleicher Ph die Art des angewendeten Alkalis keinerlei Einfluss auf den Ausfall der Reaktion ausübt.

Weiter habe ich 1 ccm einer m/100 Allantoin-Lösung auf verschiedene Ph reguliert und 15 Minuten gekocht. Dabei habe ich gefunden, dass bei Ph 85 nur geringe Mengen, bei Ph 9.0 etwa $\frac{1}{5}$, bei Ph 9.5 die gesamte Menge des Allantoins in Allantoinensäure übergeht. Bei Regulierung der Ph auf 10.0–11.0–12 wird selbst bei stärkerer Konzentration des Alkalis die gebildete Allantoinensäure nicht weiter zersetzt. (Figur 1.). Nach meinen Versuchen erscheint eine Ph von 9.5–10.0 am zweckmässigsten. Ich habe deshalb für die Allantoin-Alkalihydrolyse die Anwendung von m/20 Natriumkarbonat gestgesetzt.

Weiter habe ich untersucht, welchen Einfluss bei gleicher Alkalikonzentration die Temperatur auf die Allantoinensäurebildung hat. Dabei habe ich gefunden, dass bei Erwärmen auf 50°C während 60 Minuten bei einer Ph von 9.0 nur ganz geringe Mengen, bei einer Ph von 9.5 nur $\frac{1}{3}$ des Allantoins in Allantoinensäure überführt wird. Darüber hinaus wird auch bei Erhöhung

Fig. 1.
Alkalihydrolyse des Allantoins.



der Ph auf 10–11 keine grössere Menge Allantoinsäure gebildet.

Um nun festzustellen, ob bei der genannten Alkalikonzentration die Allantoinsäure auch bei Erhitzen beständig bleibt oder sich weiter in Ammoniak und Harnstoff zersetzt, habe ich die kochende Allantoin-Alkalilösung mit einer Vorlage von N-Schwefelsäure verbunden, doch konnte ich in keinem Falle eine Bildung von Ammoniak feststellen. Weiter habe ich nach dem Kochen Urease einwirken lassen, jedoch keinen Harnstoff nachweisen können.

Einfluss der Zeit des Erhitzens. Bei Erhitzen einer m/100 Allantoin-Lösung, der Natriumkarbonat in m/20 Konzentration hinzugefügt wurde, während 5–10–15–20–30–60 Minuten fand ich, dass während 5–10 Minuten die Überführung in Allantoinsäure

noch nicht vollständig, dagegen nach 15 Minuten vollständig war. Bei über 60 Minuten langem Erhitzen habe ich beobachtet, dass ein Teil der Allantoinsäure weiter zersetzt wurde. Da ich gefunden habe, dass die Überführung in Allantoinsäure in 15 Minuten vollständig vor sich geht, und eine weitere Zersetzung derselben auch bei Kochen bis zu 30 Minuten nicht erfolgt, habe ich als vorteilhafteste Kochzeit 15–20 Minuten festgesetzt.

II. ACIDHYDROLYSE DER ALLANTOINSÄURE.

Wenn man der durch Alkalihydrolyse gebildeten Allantoinsäure Säure hinzufügt und 1–2 Minuten kocht, dann wird durch Säurehydrolyse die Allantoinsäure in Glyoxylsäure und Harnstoff gespalten.

Nach meinen Versuchen zeigte es sich, dass bei gleicher Ph es ganz gleichgültig ist, ob man als Säure Salzsäure, Schwefelsäure oder Essigsäure zusetzt.

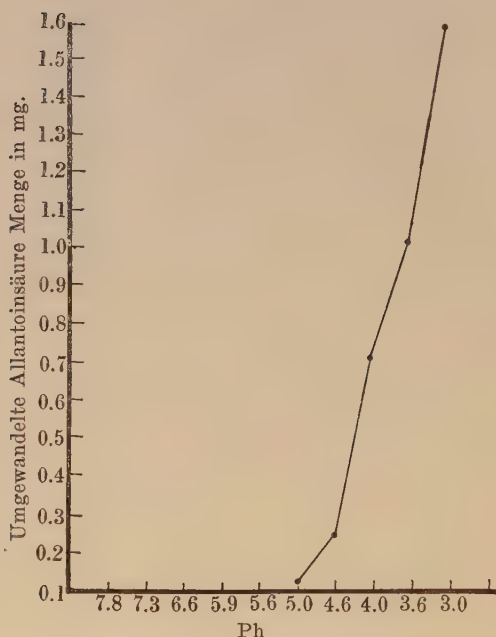
Um weiter festzustellen, bei welcher Ph die Acidhydrolyse am vollständigsten vor sich geht, habe ich der Allantoinsäure als Indikator Phenolphthalein beigelegt und mit Säure neutralisiert, darauf durch weiteren Säurezusatz die Ph auf 7.8–7.3–6.6–5.9–5.0–4.6–4.0–3.6–3.0 reguliert und nach Erhitzen während 2 Minuten die gebildete Glyoxylsäuremenge festgestellt. Die Ergebnisse zeigt die Figur 2. Demnach wird bei einer Ph von 5.0 nur eine geringe Menge, von 4.6 nur $\frac{1}{7}$, bei 4.0 nur $\frac{1}{2}$, bei 3.6 nur $\frac{2}{3}$ und bei 3.0 die Allantoinsäure vollständig zersetzt. Da die Zersetzung bei einer Ph von über 3.0 vollständig ist, genügt die Anwendung von 1 ccm einer m/100 Allantoinlösung zur Alkalihydrolyse, und nach der Neutralisierung die weitere Hinzufügung von 2 Tropfen N-Salzsäure.

III. GLYOXYLSÄURE-REAKTION.

Ich habe dann weiter festzustellen gesucht, auf welche Weise die Glyoxylsäure-Reaktion am vorteilhaftesten ausgeführt werden kann.

Fig. 2.

Acidhydrolyse der Allantoinsäure.



1. *Die vorteilhafteste Menge des anzuwendenden Phenylhydrazinhydrochlorids und des Ferricyankaliums.*

Wie die Tabelle I zeigt, fällt die Farbenreaktion bei Zusatz von 2 Tropfen 1% Phenylhydrazinhydrochlorid und 2 Tropfen 5% Ferricyankalium zu der Glyoxylsäurelösung am deutlichsten aus. Bei Zusatz dieser Lösungen im Überschuss fällt die Farbenreaktion gelblich aus.

Da die Lösung von 1%igem Phenylhydrazinhydrochlorid getrübt ist und schon nach einem Tage einen Niederschlag bildet und gelblich wird, habe ich immer 4 Tropfen einer 0.5%igen Lösung angewendet und diese alle 3 Tage frisch hergestellt.

TABELLE I.

$\frac{m}{100}$	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Allantoin (CC)									
1% Phenylhydrazin-HCl.(Gtt)	2	4	1	2	3	6	3	4	1
5% K-ferrieyanid (Gtt)	2	2	1	1	2	3	1	1	2
HCl (CC)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Grad der Färbung	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+

2. Die vorteilhafteste Menge der anzuwendenden Salzsäure.

Bei Anwendung von rauchender Salzsäure in einer Menge von 0.5–1.0–1.5–2.0–2.5–3.0 ccm zeigte es sich, dass die Stärke der Farbenreaktion bei 0.5–1.0 ccm unzureichend war, dagegen zwischen 1.5–2.0 am deutlichsten in Erscheinung trat. Bei Anwendung von 3.0 ccm wird die Farbe verändert.

Fassen wir die erhaltenen Ergebnisse zusammen, so ergibt sich als zweckmässigster Gang der Bestimmung das folgende:

Zu 1 ccm einer m/100 Allantoinlösung wird 1 ccm einer m/10 Natriumkarbonatlösung hinzugefügt, und die Lösung 15 Minuten lang auf dem Wasserbade gekocht. Nach Hinzufügung von Phenolphthalein als Indikator und genauer Neutralisierung werden weiter 2 Tropfen N-Salzsäure zugesetzt und abermals 2 Minuten auf dem siedenden Wasserbade gekocht. Vor dem Abkühlen werden dann 4 Tropfen 0.5%iges Phenylhydrazinhydrochlorid und 2 Tropfen 5%iges Ferrieyanalkalium hinzugefügt und geschüttelt, worauf die Reaktion sofort mit hellrot hervortritt. Nach 10 Minuten füllt man destilliertes Wasser bis zum Volumen von 10 ccm auf. Alsdann wird die Farbe mit der einer in gleicher Weise behandelten bekannten Glyoxylmenge verglichen. Bei Auffüllen von mehr als bis zu 10 ccm wird die Farbe immer dünner und nimmt schliesslich einen gelben Ton an.

Ich habe versucht, ob bei Schütteln mit Amylalkohol, Chloro-

form oder Xylol die Farbe in das betreffende Medium übergeht, und habe bei diesen Versuchen gefunden, dass im Falle von Chloroform und Xylol die Farbe gelblich übergeht, weshalb diese Reaktion unbrauchbar ist.

Bei Anwendung von Amylalkohol geht die Farbe in denselben gelbrot über; aber wenn die Allantoinmenge sehr gering ist, dann wird die Farbe allmählich gelb und der Farbenvergleich wird immer schwerer. Diese Farbumwandlung ist vielleicht darauf zurückzuführen, dass die Farbe des Ferricyankali mehr hervortritt. Ich habe deshalb versucht anstelle des letzteren verschiedene andere Oxydationsmittel anzuwenden und gefunden, dass bei Verwendung von Wasserstoffsuperoxyd der Zweck völlig erreicht wird; d.h. bei Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd anstelle von Ferricyankalium geht auch bei sehr geringen Mengen Allantoin die hellrote Färbung klar in den Amylalkohol über.

Allerdings darf hier nicht ausser Acht gelassen werden, dass bei Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd die Reaktion je nach der Höhe der Zimmertemperatur nicht vollständig vor einer Stunde auftritt, während sie bei Erwärmung im Wasserbade auf 30°C schon nach 20 Minuten auftritt.

Bei Anwendung von Wasserstoffsuperoxyd sind entsprechend 1 ccm einer m/100 Allantoinlösung 0.5 ccm einer m/10 Wasserstoffsuperoxydlösung vollständig ausreichend, und selbst bei Anwendung von bis zu 1 ccm treten keine Veränderungen auf, während bei Anwendung von 1.5 ccm Wasserstoffsuperoxyd sich der Farbenton verändert.

Kurz gefasst empfiehlt es sich also, der aus dem Allantoin erhaltenen Glyoxylsäure als Reagentien 4 Tropfen 0.5%iges Phenylhydrazinhydrochlorid und 0.5 ccm einer m/10 Wasserstoffsuperoxydlösung hinzuzufügen. Diese Lösung wird leicht geschüttelt, und darauf weiter 1.5 ccm rauchende Salzsäure hinzugesetzt. Schliesslich wird während 20 Minuten bei 30°C auf dem Wasserbade erwärmt. Nach vollständigem Eintreten der Farbenreaktion werden 5 ccm Amylalkohol zugesetzt, geschüttelt und stehen

gelassen, worauf sich 2 Schichten bilden. Die Färbung des überstehenden Amylalkohols wird dann mit der der Kontrolle verglichen.

Bei der nach dieser Methode behandelten Allantoin-Lösung ist zwar ein Vergleich bei Lösungen von $m/100$ bis $m/400$ auf einen cem kolorimetrisch nicht möglich, dagegen aber von $m/400$ bis $m/51,200$ auf 1 cem sehr genau durchführbar; d.h. das Mengen von 0.4 bis 0.005 mg Allantoin genau gemessen werden können.

Ob nun 1 Mol Allantoin nach der Alkali- und Säurehydrolyse in idealer Weise 1 Mol Glyoxylsäure ergibt oder nicht, um das zu erfahren, habe ich einer bekannten Menge Glyoxylsäure die bekannten Reagentien hinzugefügt, die Reaktion herbeigeführt und die entstehende Färbung mit der aus einer bestimmten Menge Allantoin entstandenen, genau in derselben Weise behandelten Glyoxylsäure verglichen und geprüft, ob die Färbung übereinstimmt oder nicht.

IV. HERSTELLUNG DER KONTROLL-GLYOXYLSÄURE.

Ich habe 2 g Magnesiumpulver mit 50 cem destilliertem Wasser übergossen, unter Abkühlung gesättigte Oxalsäure hinzugefügt, sobald die Reaktion beendet war, filtriert und in dem Filtrat jodometrisch die Glyoxylsäure bestimmt. In 1 cem des Filtrats waren 2.04 mg Glyoxylsäure vorhanden. Darauf wurde 1 cem des achtmal verdünnten Filtrats, der also 0.255 mg Glyoxylsäure enthielt, als Standardlösung benützt.

Zu je 1 cem $m/400$ und $m/800$ Allantoinlösungen habe ich die oben genannten Reagentien hinzugefügt und die entstehende Färbung mit der der Standard-Lösung verglichen. Es stellte sich heraus, dass tatsächlich der ideale Wert gefunden wird, wie die Tabelle II zeigt.

Um festzustellen, ob der Grad der Reaktionsfärbung der Standard-Lösung und die Färbung der aus Allantoin erhaltenen Glyoxylsäure bei zunehmender Verdünnung zu einander parallel verlaufen, habe ich die Lösungen entsprechend verdünnt und die

TABELLE II.

Standardlösung = Glyoxylsäure 0.255 mg.

Allantoinmenge in mg:	0.3952	0.1976
Berechnete Glyoxylsäuremenge: (mg)	0.230	0.115
Gefundene Glyoxylsäuremenge: (mg)	0.226	0.109
Differenz:	0.004	0.006

Frabenreaktion verglichen. Es ergab sich, dass sie gut übereinstimmten, wie es die Tabelle III zeigt.

TABELLE III.

Allatoin Menge:	0.1975	0.09875	0.04937	0.02968	0.01484	0.00742
Kolorimetrisch bestimmte Menge:	0.202	0.1013	0.0493	0.0289	0.0152	0.0070
Differenz:	0.005 (+)	0.0026 (+)	0	0.0007 (-)	0.0004 (+)	0.4004 (-)

V. EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN AUF DIE REAKTION.

Mit Eiweiss, Acetaldehyd, Formaldehyd, Benzaldehyd und Harnstoff fällt die Reaktion negativ aus. Auch erwiesen sich diese Substanzen nicht als Hindernisse, wenn sie beigemischt wurden.

Harnsäure zeigt mit Alkali gemischt und erhitzt eine leicht positive Reaktion entsprechend 1 ccm einer m/20000 Allantoin-Lösung. Wenn aber der zu untersuchenden Substanz reichlich Harnsäure beigemischt ist, dann muss die letztere vorher durch Mercurisulfat entfernt werden.

Die dem Harn und Kot des Menschen und von Kaninchen

beigemischten verschiedenen Substanzen stören die Reaktion in keiner Weise. Mit dem menschlichen Harn an sich fällt die Allantoin-Glyoxylsäure-Reaktion negativ aus, doch wenn diesem eine bestimmte Menge Allantoin hinzugefügt wird, dann wird sie durchaus zuverlässig nachweisbar. Im Kaninchenharn sind nur ganz geringe Mengen Harnsäure vorhanden, d.h. pro Tag ca. 5 mg. Mit meiner Methode habe ich aber pro Tag 60–70 mg Allantoin darin nachgewiesen.

Schluss.

Eine Modifikation der Farbenreaktion von Allantoin nach Fosse und Bossyt, welche die quantitative Bestimmung ermöglicht, wurde angegeben.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis Herrn Prof. Dr. K. Kodama für freundliche Leitung und gütige Anregung zu dieser Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. R. Kaneko für die mir stets gütigst gewährte Unterstützung meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Christman (1926): *Journal of biol. chem.*, **70**, 173.
Eppinger, H. (1905): *Hofmeisters Beiträge.*, **6**, 492.
Fosse und Brunel (1929): *C. r. Acad. sci. paris.*, **188**, 1632.
Granström, E. (1908): *Hofmeisters Beiträge.*, **11**, 132.
Handowsky (1914): *Zeitschr. f. Physiol. Chem.*, **90**, 211.
Langfeldt and Holmsen (1925): *Biochemical Journal.*, **19**, 715.
Pohl (1917): *Biochem. Zeitschr.*, **78**, 200.
Schloss, E. (1906): *Hofmeisters Beiträge.*, **8**, 445.
Wiechowsky (1907): *Hofmeisters Beiträge.*, **9**, 295.
Wiechowsky (1908): *Hofmeisters Beiträge.*, **25**, 109.
Wiechowsky (1911): *Biochem. Zeitschr.*, **25**, 431.

ÜBER DIE ALLANTOINASE.

VON

KISHUN RO.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)

(Eingegangen am 5. Juni 1931)

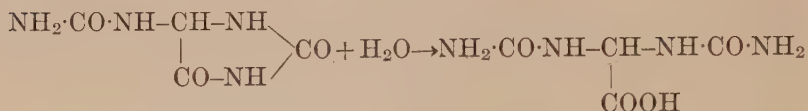
EINLEITUNG.

Przylecki hat (1925) in die Bauchhöhle des Frosches 10–15 mg Allantoin injiziert und darauf im Harn eine Zunahme an Harnstoff und Ammoniak festgestellt, die etwa 25–70% betrug.

Derselbe Autor fand, dass, wenn man einem Froschgewebeklee Allantoin beimischt und ihn bei 40°C 5–10 Tage stehen lässt, sich das Allantoin zu 30–60% in Harnstoff und Ammoniak verwandelt. Er führte diese Erscheinung darauf zurück, dass in dem Froschgewebe ein das Allantoin zersetzendes Ferment vorhanden sein müsse, das er als Allantoinase bezeichnete. Dieses Ferment verwandelt das Allantoin nach seiner Meinung zunächst in eine noch unbekannte Zwischensubstanz, aus der dann schliesslich Harnstoff und Ammoniak gebildet würden. Er meint allerdings, dass solange diese Zwischensubstanz nicht bekannt ist, eine Erklärung der Spaltungsvorgänge nicht möglich sei. Der genannte Autor fand weiter, dass durch Wirkung der Allantoinase weiter auch Glyoxylsäure und Oxalsäure gebildet werden. Er glaubt, dass neben der Allantoinase auch Urikase sich in dem Gewebe befindet, und dass die Umsetzungen wahrscheinlich in einer Weise vor sich gehen, wie sie die nachstehende Gleichung zeigt: Harnsäure→Zwischensubstanz→Allantoin→Unbekannte-Zwischensubstanz→Harnstoff + NH₃ + Oxalsäure.

Fosse und Brunel (1929) haben in den Samen vieler Leguminosen ein Ferment nachgewiesen, das Allantoin unter Anlage-

rung von Wasser in Allantoinsäure überführt. Sie gaben für diesen Vorgang die Gleichung:



Dieses Enzym bezeichneten sie als Allantoinase. Verff. fanden das Enzym nicht nur in Bohnen usw. sondern auch im Tierreiche, so bei Fischen, Fröschen, Krebstieren und Stachelhäutern.

I. DARSTELLUNG DER ALLANTOINASE-LÖSUNG.

Zum Nachweis der Allantoinase in verschiedenen Substanzen ist es nötig, diesen eine bekannte Menge Allantoin zuzusetzen und nach längerem Stehenlassen in der Wärme das restierende Allantoin einerseits und die Spaltungsprodukte andererseits qualitativ und quantitativ nachzuweisen. Dazu habe ich die kolorimetrische Methode, wie in der vorigen Mitteilung angegeben (Ro, 1931), benutzt.

Als Material zu meinen Untersuchungen dienten mir Sojabohnen und andere Bohnenarten, die Muskeln von Fröschen, weiter auch die Lebern und Nieren von Menschen, Rindern, Pferden, Hunden und Kaninchen. Ich habe jedoch die Allantoinase nur in den Leguminosensamen feststellen können, weshalb ich in diesen Blättern nur von diesen berichte.

Ich habe diese Samen 2 Tage lang in Wasser eingelegt und das Einweichwasser, die zerriebenen Keime und auch die zerriebenen entkeimten Samen gesondert untersucht und in jedem von diesen dreien die Allantoinase nachgewiesen. Da das Einweichwasser an sich schon eine blassrote Färbung zeigt, habe ich das Allantoin darin nach meiner Glyoxyl-Farbenreaktion nicht genau nachweisen können. Es war deshalb nötig die Allantoinase aus dem Einweichwasser rein darzustellen. Zu diesem Zwecke habe ich die Sojabohnen maschinell zu Mehl zerrieben, dem Pulver das

fünffache an destilliertem Wasser zugesetzt und 24 Stunden lang extrahiert. Dann wurde das Ganze unter leichter Pressung durch 4fache Gaze filtriert. Das Filtrat wurde zentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit mit der dreifachen Menge Aceton versetzt und gut umgerührt. Es entsteht dabei ein weisslicher, flockiger Niederschlag, der durch Filtrierung von der Flüssigkeit getrennt wurde. Der Niederschlag verändert an der Luft alsbald seine Farbe in rot, weshalb sehr schnell gearbeitet werden muss. Noch bevor er seine Farbe verändert hat, wird diesem Niederschlag das 3fache seines Volumens an 70%igem Äthylalkohol zugesetzt, umgerührt und nach 3 Minuten zentrifugiert. Die überstehende Flüssigkeit wird dann dekantiert, dann wieder das 3fache an 90%igem Äthylalkohol zugesetzt, umgerührt, nach 3 Minuten wieder zentrifugiert und wieder dekantiert. Dem Niederschlag wird nun das Fünffache an Äther zugesetzt, umgerührt und nach 3–4 Minuten filtriert. Von dem Niederschlag wird der Äther abgedampft, und es bleibt ein weissliches Pulver zurück.

0.5 g dieses Pulvers werden in 10 ccm destilliertem Wasser extrahiert. Die Lösung hat eine Ph von etwa 7.0 und reagiert nicht auf die Glyoxylsäure-Farbenreaktion. Zu 4 ccm dieser Lösung habe ich 1 ccm einer m/100 Allantoinlösung hinzugefügt und das Ganze bei 40–50°C erwärmt. Innerhalb 3 Stunden verwandelte sich dann das ganze Allantoin in Allantoinsäure.

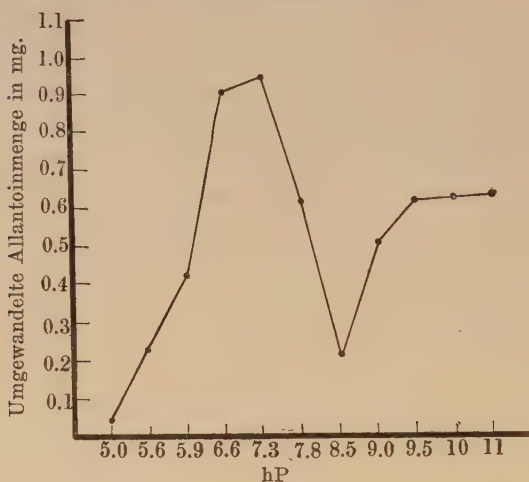
EIGENSCHAFTEN DER ALLANTOINASE-LÖSUNG.

Das obenerwähnte Extrakt aus 0.5 g Pulver in 10 ccm destilliertem Wasser habe ich als Allantoinase-Standard-Lösung angenommen. Es ist eine farblose, klare Flüssigkeit. Die Eiweiss-Kochprobe, Millon'sche Probe, Glyoxylsäure-Reaktion und die Biuret-Reaktion fallen sämtlich positiv aus. Die Zucker-Probe ist negativ. Durch Alkali wird kein Niederschlag ausgefällt, wohl aber durch Trichloressigsäure und Sulfosalicylsäure. Wenn die Ph über 5.0 beträgt, dann wird durch Essigsäure, Schwefelsäure und Salzsäure ein Niederschlag ausgefällt.

DAS PH-OPTIMUM.

Je 4 cem der Standard-Lösung habe ich nach verschiedenem Ph reguliert, 1 cem einer m/100 Allantoinlösung hinzugegeben und bei 50°C 1 Stunde lang stehen lassen. Darauf habe ich das restierende Allantoin und die gebildete Allantoinsäure quantitativ bestimmt. (Fig. 1). Die Lösung von Ph 4.6 hat gar keine Wirkung,

Fig. 1.
Ph Optimum.



die Lösungen von Ph 5.0 an aufwärts zeigen eine allmählich mit dem Ph steigende Wirkung, deren Maximum bei Ph 7.3 liegt. Danach tritt allmählich eine Abnahme ein, die bei Ph 8.5 das Minimum erreicht. Merkwürdigerweise nimmt von da an die Wirkung scheinbar von Ph 8.5–9.0–9.5 wieder zu, doch ist diese scheinbare Wirkung nur auf die zersetzende Wirkung des Alkalis zurückzuführen.

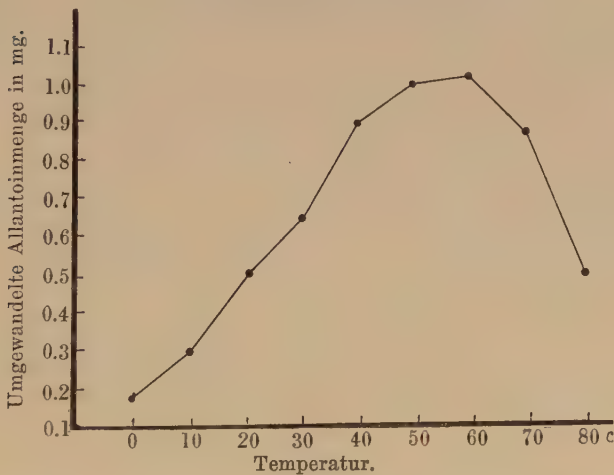
TEMPERATUR-OPTIMUM.

Bei Erhitzen der Standard-Lösung auf 70°C während 30 Minuten wird die Wirkung derselben leicht herabgesetzt, bei 80°C

während 30 Minuten sinkt die Wirkung auf die Hälfte herab und geht bei 90°C während 10 Minuten und 100°C während 3 Minuten völlig verloren.

Nach Hinzufügen von 1 cem einer m/100 Allantoin-Lösung zu 4 cem der Standard-Lösung und Regulierung auf Ph 7.3 durch Zusatz von 3 cem Phosphatpuffer, Aussetzen auf Temperaturen von 0–80°C während einer Stunde und Messung der gebildeten Allantoinensäure ergibt sich das folgende Bild: (Fig. 2.)

Fig. 2.
Temperatur Optimum.



Die Wirkung ist zwischen 50–60°C am stärksten, weshalb ich diese Temperaturen als Optimum angenommen habe.

REAKTIONSGESCHWINDIGKEIT DER ALLANTOINASE.

Ich habe 3 cem Allantoinase-Lösung auf 1 cem einer m/100 Allantoinlösung (zugefügt mit Phosphatpuffer: Ph 7.3) bei 50°C einwirken lassen und während der Einwirkung aller 10 Minuten die in Allantoinensäure umgewandelte Allantoin-Menge untersucht. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle I.

TABELLE I.
Reaktionsgeschwindigkeit.

Zeit (Min.)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120
Umgewandelte Allantoin-Menge in mg:	0.23	0.33	0.40	0.46	0.53	0.61	0.69	0.75	0.83	0.87	0.93	0.99
$K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x} \times 100$	0.68	0.51	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4

Wie aus der Tabelle hervorgeht, entspricht die Reaktionsgeschwindigkeit der Allantoinase der monomolekularen Reaktion fast vollständig.

DIE DURCH DIE WIRKUNG DER ALLANTOINASE ENTSTEHENDEN SPALTUNGSPRODUKTE.

Fosse und Brunel behaupteten, dass durch die Wirkung der Allantoinase aus Allantoin Allantoinsäure gebildet werde, Przylecki nahm die Bildung einer Zwischensubstanz an, aus der dann die Spaltung weiter in Harnstoff und Ammoniak fortgesetzt werde. Um den tatsächlichen Verlauf der Umsetzungen aufzuklären, habe ich die nachstehenden Untersuchungen ausgeführt.

Zuerst habe ich festgestellt, dass bei Kochen einer Allantoin-Lösung während 30 Minuten bei 100°C und auch einer Allantoin-Lösung von Ph 5.0–8.0 bei 50°C während 1 Stunde dieselbe in keiner Weise Veränderungen erleidet. Weiter habe ich eine bestimmte Menge Allantoinase (Ph 73.) auf eine bestimmte Menge Allantoin bei 50°C während einer Stunde einwirken lassen und darauf die Glyoxylsäure-Reaktion ausgeführt, habe jedoch gefunden, dass diese negativ ausfiel. Wenn aber der Ph der vorgenannten Lösung nach der Erwärmung auf 3.0 reguliert, und die Lösung dann während 3 Minuten gekocht wird, dann fällt die Glyoxylsäure-Reaktion positiv aus, und zwar entsprechend dem Grade der Allantoinsäure-Bildung. Ich habe dann die gebildete Allantoinsäure-Menge und ebenso auch die restierende Allantoin-

Menge bestimmt und gefunden, dass beide der ursprünglichen Allantoin-Menge entsprechen.

Darauf habe ich untersucht, ob in der vorgenannten Lösung während des Erwärmens Ammoniak entsteht, habe jedoch keines feststellen können. Auch habe ich nach dem Erwärmen der Lösung Urease zugesetzt, jedoch das Vorhandensein von Harnstoff nicht feststellen können.

Aus meinen Untersuchungsergebnissen geht also hervor, dass durch die Wirkung der Allantoinase das Allantoin nur in Allantoinensäure umgewandelt wird. Es handelt sich also bei der unbekannten Zwischensubstanz, die Przylecki angenommen hat, nur um Allantoinensäure.

SCHLUSS.

1. Eine neue Darstellungs-Methode von Allantoinase aus Sojabohnen ist angegeben.

2. Die Ph- und Temperatur-Optima der Allantoinase sind beziehungsweise 7.3 und 50°–60°C.

3. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Allantoinase entspricht der monomolekularen Reaktion.

4. Die Spaltungsprodukte des Allantoins durch dieses Ferment sind nur Allantoinensäure.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis Herrn Prof. Dr. K. Kodama für freundliche Leitung und gütige Anregung zu dieser Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. R. Kaneko für die mir stets gütigst gewährte Unterstützung meinen allerherzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Fosse und Brunel (1929): C. r. Acad. sci. Paris, 188, 426.

Fosse und Brunel (1929): C. r. Acad. sci. Paris, 188, 1067.

Przylecki (1925): Arch. int. Physiologie, 24, 236.

Ro (1931): J. of Biochem. 14,

ÜBER DEN ALLANTOINGEHALT DES HARNS VON NEUGEBORENEN UND SCHWANGEREN, UND DES AMNIONSWASSERS.

VON

KISHUN RO.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama)
der Medizinischen Fakultät der Kaiserlichen Kyushu-
Universität zu Fukuoka.)*

(Eingegangen am 5. Juni 1931)

Im Fruchtwasser des Rindes hat zuerst Vauquelin (1799) das Allantoin nachgewiesen. Lassaigne (1821) hat diese Angabe nachgeprüft und bestätigt. Wöhler (1849) hat die Ausscheidung von Allantoin im Harn von saugenden Kälbern beobachtet, und Meissner hat das Allantoin auch im Harn von anderen Säugtieren gefunden. Gusserow, Ziegler, Hermann (1872) u. a. stellten auch im menschlichen Harn ganz geringe Mengen Allantoin fest, und zwar fanden sie, dass im Harn von Neugeborenen und Schwangeren etwas grössere Mengen ausgeschieden werden, als das bei gesunden Erwachsenen der Fall ist.

Wiechowski (1907/08) hat zuerst eine quantitative Bestimmungsmethode des Allantoins erdacht und mittels seiner Methode (1911) im Tagesharn von Erwachsenen etwa 10 mg Allantoin nachgewiesen. Diese Angabe ist von mehreren Forschern nachgeprüft worden; und weiter wurde festgestellt, dass bei purinreicher Diät der Gehalt des menschlichen Harns an einer dem Allantoin ähnlichen Substanz zunimmt.

Abderhalden (1920) behauptete, dass da im menschlichen Körper keine Urikase vorhanden ist, sich folglich im Körper auch kein Allantoin bilden könne. Er ist der Ansicht, dass wenn sich im Harn zeitweise Allantoin nachweisen lässt, dieses mit der Nahrung aufgenommen worden sein müsse und mit dem Harn

wieder ausgeschieden werde.

Jedenfalls fehlen bis heute noch bestimmte Angaben über den Allantoingehalt des menschlichen Harns; auch besitzen wir solche noch nicht über den Allantoingehalt des Harns von Neugeborenen und Schwangeren.

Ich habe deshalb zunächst quantitative Bestimmungen der Allantoinmenge im Harn von gesunden Erwachsenen nach den bisher als den genauesten bekannten Methoden von Wiechowski und deren Modifikation von Handovsky und Phol (1917) vorgenommen, doch an diesen derartig viele Nachteile gefunden, dass ich diese Versuche aufgegeben habe.

Die Wiechowski'sche Methode ist ausserordentlich kompliziert, und die Verluste an Allantoin dabei sind gross; dazu ist diese Methode bei Untersuchung von Substanzen, die reich an Chlor und Harnstoff sind, unzuverlässig. Auch Langfeldt und Halmsen (1925) haben festgestellt, dass wenn das zu untersuchende Material Harnsäure und verschiedene Aminosäuren enthält, der Wert für das Allantoin immer zu hoch ausfällt. Ich habe beobachtet, dass bei Analyse des menschlichen Harns nach der Methode von Wiechowski in der Endflüssigkeit immer noch Harnsäure enthalten ist, und daher mit Quecksilberacetat ein Niederschlag ausfällt.

Ich habe bei meinen Untersuchungen aus dem menschlichen Harn zunächst mittels Phosphorwolframsäure und Quecksilbersulfat die Salze und die Harnsäure tunlichst entfernt und in der Endflüssigkeit das Allantoin mittels der Glyoxylsäure-Farbreaktion kolorimetrisch bestimmt. Im Harn von Erwachsenen konnte ich kein Allantoin feststellen. Wenn ich aber dem Harn eine bestimmte Menge Allantoin zusetzte, habe ich mittels meiner Methode immer wieder die ganze Menge kolorimetrisch nachweisen können. Ich habe deshalb mittels der kolorimetrischen Methode die nachstehenden Untersuchungen vorgenommen:

I. DER HARN VON SCHWANGEREN.

Als Material diente mir der Harn von solchen Schwangeren vom 2. bis 10. Schwangerschaftsmonate, bei denen in der Gynäkologischen Klinik unserer Fakultät die Schwangerschaft einwandfrei festgestellt worden war.

Zunächst habe ich zu 50 ccm des Harns 10 ccm einer 10%igen Phosphorwolframsäure-Lösung hinzugefügt, umgerührt und nach 30 Minuten zentrifugiert. Der überstehenden Flüssigkeit wurden 5 g Bleioxyd-Pulver zugesetzt und nach 5 Minuten zentrifugiert. Der überstehenden Flüssigkeit habe ich dann 1%ige Quecksilberacetat-Lösung in einer grösseren Menge als zur Sättigung nötig war, hinzugegeben. Das Allantoin verbindet sich mit dem Quecksilber und fällt in dem Niederschlag aus. Diesem Niederschlag wurden 5 ccm destilliertes Wasser hinzugefügt, umgerührt, und darauf Schwefelwasserstoff durchgeleitet. Nachdem das Quecksilber ausgefällt war, wurde filtriert, und durch das Filtrat zur vollständigen Entfernung des Schwefelwasserstoffs Luft geleitet. Darauf wurden der Reihe nach die Alkalihydrolyse und die Acidhydrolyse ausgeführt, die Glyoxylsäure-Reagentien hinzugefügt, und die entstehende Farbenreaktion mit der der Kontrolle verglichen. Nach dieser Methode habe ich zahlreiche Fälle untersucht und zwar in verschiedenen Schwangerschaftsmonaten, in keinem Falle aber Allantoin nachweisen können. Zur Kontrolle habe ich dann immer noch dem betreffenden Harn eine bestimmte Menge Allantoin zugesetzt und diese dann mittels desselben Analysenganges immer vollständig wieder nachweisen können.

Aus diesen Untersuchungen geht also hervor, dass im Harn von Schwangeren sich kein Allantoin vorfindet.

II. DER HARN VON NEUGEBORENEN.

Aus der Tokologischen Klinik unserer Universität habe ich zur Untersuchung auf Allantoin den erstmaligen Harn von Neu-

geborenen, sowie den der Kinder 2–3 Tage nach der Geburt erhalten.

Den Harn habe ich fünffach verdünnt und bin zur Allantoin-Bestimmung im übrigen genau so verfahren wie oben beschrieben. Ich habe in keinem Falle Allantoin feststellen können. In den Fällen, in denen ich den Harn der Neugeborenen nach der Methode von Wiechowski untersucht habe, fand ich den Allantoin-Gehalt beziehungsweise den an einer ihm ähnlichen Substanz höher als bei Erwachsenen. Das ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass der Harnsäure-Gehalt von Neugeborenen zum ersten Mal gewöhnlich 3–4 mal so hoch ist als bei Erwachsenen, während der Harn der Kinder vom 2.–3. Tage nur $\frac{1}{2}$ – $\frac{1}{3}$ des Harnsäure-Gehaltes der Erwachsenen besitzt. Damit dürfte sich wohl auch die Verminderung der dem Allantoin ähnlichen Niederschläge, die bei der Methode von Wiechowski festgestellt werden, erklären.

III. DAS AMNIONWASSER.

Das Material zu diesen Versuchen ist mir gütigerweise aus der Tokologischen Klinik unserer Fakultät in frischem Zustande überwiesen worden.

Da das Amnionwasser reichlich Eiweiss und mässige Mengen Harnsäure enthält, habe ich zu 10 ccm Amnionwasser 3 ccm m/2 Sulfosalcylsäure-Lösung hinzugefügt, dadurch Eiweiss und Harnsäure ausgefällt, zentrifugiert, und der überstehenden Flüssigkeit im Übermass 1%iges Quecksilberacetat zugesetzt, um Allantoin als Quecksilberallantoin auszufällen. Darauf wurde filtriert, dem Niederschlag 3 ccm destilliertes Wasser hinzugefügt, Schwefelwasserstoff durchgeleitet und das Filtrat mittels der Glyoxylsäure-Farbenreaktion untersucht. Die Kontrolle wurde wie oben erwähnt durchgeführt. Es ist mir nicht gelungen in dem Amnionwasser Allantoin nachzuweisen.

Nach allem stelle ich fest, dass es mir in keinem Falle gelungen ist, Allantoin in dem Harn von Neugeborenen oder Schwangeren oder im Amnionwasser festzustellen.

Am Schlusse dieser Arbeit ist es mir aufrichtiges Bedürfnis meinen hochverehrten Lehrern, den Herren Prof. Dr. K. Kodama für Anregung und Leitung bei dieser Arbeit und Prof. Dr. M. Shiraki für die sehr gütige Überlassung des Materials meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Abderhalden (1920): Lehrbuch d. physiol. Chem., 4 Auflage.
Hammarsten (1926): Lehrbuch d. physiol. Chem., 11. Auflage.
Lassaigne (1821): Annal. de Chem. et Physiol., 17, 301.
Meissner: Zeitschr. f. rat. Med. (3), 31.
Vauquelin (1799): Annal de Chem., 33, 269.
Ziegler und Hermann: Arch. f. Gynäkol., 3 (zitiert nach Huppert-Neubauer, S. 377.)

THE CHANGE IN THE AMOUNT OF BLOOD-CHLORINE DURING ASPHYXIATION FROM THE VIEW-POINT OF ACIDOSIS.

Report II.

BY

TAKESHI SASO.

(From the Department of Forensic Medicine, Hokkaido Imperial University.
Director: Prof. K. Yamakami.)

(Received for publication, June 5, 1931)

I. INTRODUCTION.

In a previous work (1930), I have studied in detail the change in the amount of blood chlorine and especially the behaviour of plasma chlorine during asphyxiation. In the present work, the effect of administration of acids on the blood chlorine has been investigated in order to get a glimpse into the relationship between the asphyxial acidosis and chlorine exchange. It has been experimentally and clinically established already by many others that acidosis changes the amount of blood chlorine. Blum (1926) and his coworkers often observed the depletion of chlorine content of blood in diabetic acidosis accompanying the lowering of alkali value, and observed also the simultaneous diminution of Na in plasma.

They ascribed it to the excessive elimination of Cl and to the disturbance of the chlorine-restoring ability of corpuscles. Concerning the diminution of Na in plasma they suggested that some part of plasma Na is eliminated in urine, and some taken up into tissues. According to Mainzer, Fritz and Joffe (1928), the blood-Cl increases in the ammonium chloride-acidosis and the bicarbonate ions diminish in the initial acidotic phase, while in the following phase of alkalosis the Cl ions decrease and the bicarbonate

ions increase. Salvesen and his coworkers (1924) demonstrated that the administration of calcium chloride produces a marked acidosis, and an increase of chloride and decrease of Na in the plasma. Birrel and Cruickshank (1924) have shown that in the tetanic state of dogs deprived of parathyroid gland the chlorine content of corpuscles decreases markedly in the initial stadium alkalosis, while in the stadium of acidosis the decrease of total chlorine occurs only in the blood cells, the chlorine content of plasma remaining unchanged. If the fall of CO_2 -content is still shown in plasma in the second period, the percentage diminution of corpuscle chlorine is always widely larger than in plasma. Bulger and his coworkers observed that (1926) in the acidosis due to chronic nephritis the concentration of plasma chloride is high when the bicarbonate content is markedly lowered. Thiers (1929) observed the diminution of chlorine and alkalinity in blood in acidosis due to nephritis, and their increase in tissues. According to Benard and his coworker (1929), the renal acidosis results in the retention of chloride in plasma, and the renal alkalosis results in that of Na in plasma. Salvesen (1928) stated that in the diabetic and uraemic acidosis the chloride in plasma can act as a neutralities-regulator, and its base is partly given off in order to neutralize the excessive acid, and the Cl, which is separated from the base, is released from the blood, thus the diminution of chloride concentration of plasma is a poor indication of these diseases. Concerning the behaviour of erythrocytes chlorine in acidosis, Schwarz and Schmid (1928) showed that in experimental acidosis caused by the administration of phosphoric acid the chlorine in corpuscles increases in amount. Landau, Glass and Kaminer (1929) have observed the increase of the chlorine value of corpuscles in nearly all cases of acidosis, and they stated that the rise of chlorine-bindings-index (ratio of chlorine content of corpuscles to chlorine content of plasma) over 0,55 indicates acidosis (the normal value of the index is 0,52 and constant). According to Akiya Minoru (1928), in feverish diseases, acidosis and hyperchloremia appear in

the fever period while alkalosis and hypochloremia are found after fever.

From these observations made by various investigators it may be concluded that the amount of blood chlorine changes in acidosis, but the change is not regular; that is, acidosis is accompanied sometimes by hyperchloremia and sometimes by hypochloremia. Such is also the case as to the change in the amount of plasma chlorine in acidosis. On the contrary however, the change in erythrocytes-chlorine seems to be nearly uniform in all sorts of acidosis; that is the chlorine content of blood cells almost always increases without regard to the kinds of acidosis.

II. EXPERIMENT I.

As experimental animals rabbits were employed, and for provoking acidosis phosphoric, acetic, oxalaric and lactic acid were used. The acids were diluted to about 5 percent boiled solution of starch in order to protect the mucous membrane of the stomach (Toyota, 1927) from injury by the administration of the acid. The control blood sample was first withdrawn by heart puncture from the left ventricle with a hypodermic needle containing a small quantity of powdered potassium oxalate as an anticoagulant. Then a given quantity of the acid-solution was administered per os by use of Nelatons Katheter. Always a large amount of acid was given so that the animals died within a few hours. As soon as the animal died the blood was collected in the same way as is mentioned above.

The preparation of plasma as well as the determination of chlorine were carried out in the same manner as described in the previous paper.

As table I shows, the acid administrations were constantly followed by an increase in the amount of chlorine in the whole blood. On the contrary, however, the influence of acid administration on the chlorine content of plasma was not uniform. Some (No. 20, 21, 24, 25 etc.) showed an increase, whereas others showed

TABLE I.

Rabbits number	Sorts and quantity of acid administered	Before administration of acid	After administration of acid	Time interval to death or blood collection	Dead or alive
No. 20 Blood Plasma Corpuse.	(Phos. acid) 5% 70 cc	447,5 497,2 19,9	485,5 517,7 37,4	2 hours	alive
No. 21 Blood Plasma Corpuse.	5% 100 cc	421,2 467,2 59,7	494,3 517,7 64,3	40 minutes	died
No. 22 Blood Plasma Corpuse.	5% 90 cc	441,6 502,6 26,3	468,0 502,6 32,2	1,5 hours	died
No. 23 Blood Plasma Corpuse.	5% 65 cc	476,7 504,9 20,4	482,6 491,4 32,2	3,5 hours	died
No. 24 Blood Plasma	5% 40 cc	432,9 482,6	459,0 494,3	1,2 hours	alive
No. 25 Blood Plasma	5% 70 cc	386,1 444,6	421,3 979,7	2 hours	alive
No. 26 Blood Plasma	5% 100 cc	459,2	485,5	45 minutes	died
No. 27 Blood Plasma	(Lactic acid) 5% 60 cc	478,7 500,1	498,6 514,0	2 hours	alive
No. 28 Blood Plasma	5% 70 cc	456,2 517,3	462,6 545,0	2 hours	alive
No. 29 Blood Plasma	5% 100 cc	424,9 503,1	478,8 468,0	6 hours	died

No. 30 Blood Plasma	(Oxalic acid) 5% 100 cc	450,4 538,2	460,0 544,0	35 minutes	died
No. 31 Blood Plasma	5% 70 cc	441,6 502,4	489,8 479,7	70 minutes	died

a reduction of plasma chlorine. As will be noticed in the table, such a difference in the results seems to depend upon the length of time up to the death of the animals. For instance, in the cases where the animals died slowly (No. 29, 23), the amount of plasma chlorine was decreased; while it was increased in the cases which died relatively quickly (No. 21, 26, 30). These findings suggest to us that the acidosis causes first an increase, and then a decrease in the chlorine content of plasma. A similar relation was very often encountered in cases of asphyxia, especially in prolonged asphyxia, as has been described in the previous paper. We have seen an increase in the amount of plasma chlorine at an earlier stage and a decrease at a later stage of prolonged suffocation. Even in the cases of acute asphyxia, a decrease in the chlorine content of plasma was observed when the blood sample was taken long after the death of animals (postmortem phenomenon).

II. EXPERIMENT II.

The next experiment was made in order to prove that the decrease in the amount of plasma chlorine which has been observed in Experiment I is not a postmortem phenomenon. When the chlorine content of plasma and blood had been increased by the first administration of acid a certain amount of acid solution was given again. And a third blood sample was taken just before the death of the animals. The results are given in table II.

As table II shows, the content of plasma chlorine was mostly lowered in the third blood samples while the hyperchloremic value of the whole blood remained unchanged. Thus it is quite evident that the increase in the amount of plasma chlorine is soon followed

by a decrease in length of life. In a few cases (No. 34), however, the hyperchloremic value of the plasma remained unchanged in the third blood sample. This might have been due to the circumstance that the amount of acid administered was too much, and consequently the animal died too quickly before the occurrence of hypochloremia in the plasma.

III. EXPERIMENT III.

In the experiment so far mentioned, only cases of severe acidosis have been investigated. I have therefore studied in the third experiment the cases of slight acidosis in which the animals could survive the administration of acid. The results are shown in table III.

TABLE II.

No. 63. 70 cc. 5% phosphoric acid administered.

Before administration	60 minutes after administra- tion	120 minutes after administra- tion	Second adminis- tration of 40 cc 5% phos. acid	180 minutes after first adminis- tration of acid	Died after 245 minutes
526,5	567,4	549,9		508,9	

No. 60. 70 cc. 5% phosphoric acid administered.

Before administration	120 minutes after administra- tion	Second adminis- tration of 50 cc 5% phos. acid	160 minutes after first adminis- tration	175 minutes after first adminis- tration	Died after 175 minutes
473,8	491,4		432,0	421,2	

No. 36. 70 cc. 5% phosphoric acid administered.

Before administration	120 minutes after adminis- tration	Second adminis- tration of 40 cc 5% phos. acid	175 minutes after first administered	Died after 175 minutes
444,6	479,7		418,2	

No. 34. 30 cc. 5% phosphoric acid administered.

Before administration	90 minutes after administration	Second administration of 120 cc 5% phosphoric acid	120 minutes after first administration	Died after 120 minutes
482,6	494,3		511,8	

No. 35. 35 cc. 10% phosphoric acid administered.

Before administration	120 minutes after administration	Second administration of 20 cc 10% phosph. acie	165 minutes after first administration	Died after 175 minutes
451,6	482,7		462,3	

No. 61. 50 cc. 10% lactic acid administered.

Before administration	120 minutes after administration	Second administration of 40 cc 10% lactic acid	180 minutes after first administration	360 minutes after first administration	Died after 360 m.
503,1	520,6		490,6	468,0	

TABLE III.

No. 39. 50 cc. 10% lactic acid administered (alive)

Before administration	After 1 hour.	After 2 hours	After 3 hours	After 4 hours	After 5 hours	After 7 hours	After 26 hours
459,2	488,7	488,9	497,6	497,2	473,8	459,2	462,2

No. 40. 45 cc. 10% lactic acid administered (alive)

Before administration	After 1 hour.	2 hours	3 hours	4 hours	5 hours	6 hours	2,5 hours
508,1	517,7	526,6	523,3	526,5	506,0	509,3	503,3

No. 41. 40 cc. 10% phosphoric acid administered (alive)

Before administration	After 0,5 hrs.	After 1 hours	After 1,5 hrs.	After 2 hours	After 2,5 hrs.	After 3 hours	After 3,5 hours
473,8	497,2	514,8	517,7	541,1	529,4	520,6	522,6

No. 42. 35 cc. 10% phosphoric acid administered. (alive)

Before administration	After 0,5 hr.	1 hr.	1,5 hrs.	2 hrs.	2,5 hrs.	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.
492,2	509,7	518,3	529,0	546,4	535,3	523,9	513,7	514,8

No. 43. 15 cc. 10% phosphoric acid administered. (alive)

Before admini.	After 1 hr.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.	6 hrs.	7 hrs.	8 hrs.	9 hrs.	24 hrs.
487,2	513,1	525,1	521,1	519,2	512,1	509,6	502,7	492,7	484,7	490,2

No. 44. 35 cc. 10% lactic acid administered. (alive)

Before admini.	After 0,5 hr.	1 hr.	1,5 hrs.	2 hrs.	3 hrs.	4 hrs.	5 hrs.	6 hrs.	7 hrs.
493,1	499,4	504,6	510,7	509,9	502,3	491,9	494,2	494,2	495,6

As indicated in the table III and chart I, the change in the amount of plasma chlorine is very interesting in cases where a relatively small quantity of acid has been administered and the animals could survive it. Namely, a rise in the chlorine content of plasma appears within about 20 minutes after the administration of the acid and the maximal amount of hyperchloremia is attained within 2-3 hours. From this point the chlorine content of plasma begins to decrease gradually and returns to the normal level after 5-7 hours. As stated before, a hypochloremic state of plasma very often follows the increase of plasma chlorine in severe cases of acidosis. But in slight cases, such a phenomenon never occurs.

IV. EXPERIMENT IV.

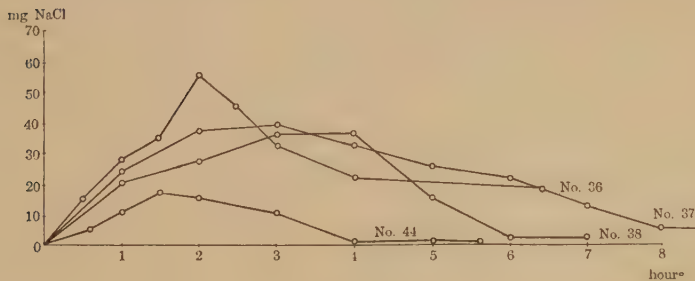
As will be discussed later, it is evident that by adding acid to blood or by treating blood with high tension of CO the corpuscles gain more Cl, and that the increase in the amount of chlorine in

TABLE IV.

Rabbits number	Quantity of acid administered (5% phosphoric acid)	Before administration	After administration	Time up to blood collection
43	40 cc	162,3	168,7	9 minutes
44	100 „	186,3	224,2	20
45	60 „	143,8	165,7	30
46	80 „	145,7	197,5	40
	(10% lactic acid)			
47	70 cc	154,9	186,3	25
48	80 „	145,8	170,8	30
49	50 „	186,4	223,7	40
50	40 „	126,7	135,2	15
51	40 „	136,0	164,6	35
55	30 „	183,4	146,9	12
56	25 „	134,3	171,6	10

Chart I.

The increase in the amount of plasma chlorine after the administration of a relatively small quantity of acid.



corpuseles may be considered as an indication of acidosis in vivo. We have already described before a few cases among our experiments in which the results seem to accord with this assumption. We wish to add some more examples of this sort in which the determination of chlorine was carried out in various periods after the administration of acid.

As table IV shows, corpuseles gain actually more chlorine after acid administration.

DISCUSSION.

The fact is well known that an interchange of various substances (molecules and ions) takes place between erythrocytes and plasma as well as between blood and tissues when the reaction of the blood is altered.

Humburger (1892) showed that when the blood is treated with acid or alkali, not only various inorganic salts, such as chloride, phosphate, carbonate, etc., but also organic substances such as sugar, protein and fat may interchange between corpuseles and plasma. The same author also demonstrated (1918) the conveyance of Cl into corpuseles from plasma by the addition of dilute SO_4H_2 solution to the blood. Snapper (1913) and Limbeck (1894-1895) could also confirm the migration of Cl and some other substances into corpuseles under the influence of SO_4H_2 . Not only in the experiments in vitro, but also in vivo the similar interchange of Cl has been caused by the injection of acid (Snapper, 1913). Limbeck ascribes this phenomenon to a still unknown effect of acid on the blood cells, probably on its membrane or stroma. Humburger has also assumed that the interchange of various substances between plasma and blood cells is due to the alteration of the permeability of cell membrane caused by the effect of acid.

Concerning the similar effect of CO_2 , many reports have been forwarded by various investigators (Humburger 1918, Limbeck 1894-1895, Snapper 1913, Van Slyke and Cullen 1917, Collip 1921, Eisenmann, Harold, Bulger and Peter 1926, Haggard

and Henderson 1920, Hasselbalch and Warburg 1918, Doisy and Eaton 1921, Doisy and Beckmenn 1922, etc.). Hasselbalch and Warburg have shown that the acid-binding-power of serum becomes greater while that of corpuscles is lessened at a corresponding degree when the blood is treated with high tension of CO_2 in vivo. And the serum obtained in a higher CO_2 -tension has a greater acid-combining power than that obtained in a lower CO_2 -tension. Straub and Meier (1918) and Dautrebande (1922) have also found the increase of CO_2 -combining power in the acidified whole blood.

It is also a well settled fact that bicarbonate or alkaline of serum increases in amount when the blood is treated with high tension of CO_2 (Doisy and Eaton 1912, Haggard and Henderson 1920, Eisenmann, Harold, Burger and Peter 1926, Gurber 1895, Vay Slyke and Cullen 1917).

The interchange of substances or ions such as phosphate, base, Cl , CO_3H etc., between plasma and corpuscles, due to the effect of CO_2 or other acid is generally regarded as a buffering action of the blood controlling its reaction. Eisenmann and his coworker (1926) state that the transfer of chloride into cells in response to the increase of CO_2 -tension effects in the liberation of base in plasma with the consequence that the CO_2 -combining power or the buffer value of plasma increases.

The chloride which passes into the blood cells robs protein of cells of an equivalent amount of base, and the high concentration of protein in the cells provides an ample excess of base for this purpose. Practically the buffer of cells is rendered available to plasma, and it is pretty certain that a similar reaction must occur between plasma and tissues and between tissue cells and tissue fluid.

Indeed the assumption has been made by many authors that Cl may move between corpuscles and plasma even under physiological conditions, corresponding to the change in the reaction of plasma. According to Doisy and his coworker (1922), the migration of hydrochloric acid that can be demonstrated in the

test tube actually occurs also in the body under physiological conditions. They state that hemoglobin loans buffer to plasma by means of the shift of hydrochloric acid in the body, as well as in the test tube. According to them, this phenomenon is due partly, at least, to the alteration of osmotic pressure; that is as base is taken from the buffer to bind carbon dioxide, more ions are produced in the solution, and this increase of ions occurs more rapidly in the cells due to their greater buffer value and consequently water is withdrawn from the plasma to maintain the already existing reaction.

Doisy and Eaton (1921) state that hemoglobin seems to be far the most important factor in the transport of CO_2 from the tissues to the lung. As it is non-diffusible, an auxiliary reaction is utilized to assist the plasma to take up or give off CO_2 . This mechanism is a shifting back and across the cell membrane of hydrochloric acid and this process depends upon a very slight change in the hydrogen ion concentration of plasma. And they further state that in capillaries where the tension of CO_2 is higher, the hydrogen ion concentration of plasma tends to increase. This produces a shift of HCl to the cells. At the same time there is a reduction of the oxyhemoglobin which alone would produce a more alkaline reaction within the cells. These two effects are normally so well balanced that there is practically no alteration in the pH of blood.

Peter and his coworker (1926) could show that arterial and venous blood may contain different amounts of chloride, and the venous blood contains more acid than the arterial. They concluded that although it is impossible to ascribe various changes of blood constituents to definite causes, it is probable that they are all due to a reaction between tissues and plasma, quite similarly to those that govern the exchange between blood cells and plasma *in vitro* in response to the alteration in the amount of carbon dioxide or other electrolytes. The alteration that occurs in the tissues are, however, of greater complexity than any that can be reproduced

in the test tube and consequently produce a more complex disturbance of the blood electrolytes.

Snapper (1913) could demonstrate *in vivo* (dog) a relative increase of diffusible alkaline in serum by injecting tartaric or sulphuric acid, and presumed from these results that the movement of chlorine from serum into corpuscles under the effect of acid does not result either from the separation of diffusible ions in blood cells or in serum, but they are caused by the alteration of permeability of blood cells, produced by the influence of acid. Gürber regards that the increase of alkaline value in plasma, which is caused by saturating the blood with CO_2 , is due to the passage of hydrochloric acid from plasma into cells, the amount of HCl thus entering the cells being equivalent to the gain in the amount of titrable alkali in plasma.

According to Joffe and Poulton (1920-1921), the oxygenation of blood causes a diffusion of acid from corpuscles to plasma, and conversely a diffusion of base from plasma to corpuscles. They explain this phenomenon by saying that if hemoglobin could diffuse out into plasma, oxygenation of blood would cause this sort of diffusion, since this process causes an increase in Ch inside the corpuscles and there would be a tendency to equalise the Ch on each side of the corpuscular envelope.

Since hemoglobin is indiffusible this tendency to the equalisation of Ch is brought about by the diffusion outwards of other acids which are diffusible or the diffusion inwards of diffusible base. These considerations point to the extreme complexity of the factors influencing the interchange between corpuscles and plasma actually occurring in the body when the blood passes through the lung or enters the tissues. They further state that in the latter cases, the increase in the CO_2 -tension causes by itself a diffusion of acid into the corpuscles, while the partial reduction of hemoglobin intensifies this process. Doisy and Beekmenn (1922) have proved experimentally that when acid or CO_2 acts on the blood *in vitro* or *in vivo*, whatever the mechanism may be, the plasma or serum gains

a greater CO_2 -combining power or more alkaline and loss in its chlorine, resulting in an increase in chlorine content of corpuscles. Such an interchange of chlorine between plasma and corpuscles is supposed to occur in the physiological condition during the passage of blood through the capillaries when the blood changes from arterial to venous. Similar phenomena are also presumed to take place between tissue cells and tissue fluid.

In a few cases of my experiments the acid administration has resulted in a decrease of chlorine content of plasma, and accordingly it well accords with the experimental facts found by many investigators.

In most of the cases, however, contrary to the results obtained in the test tube by many investigators, the blood plasma gained more chlorine after the acid ingestion. The acidosis, therefore, does not seem to result necessarily in a diminution of plasma chlorine, but very often in the increase of chlorine content of plasma. The hypochloremia in plasma can not always be regarded as a reliable indication of acidosis, contrary to the opinion of some authors (Heilmeyer 1927), but rather, the hyperchloremia is very often followed by acidosis.

The only objection which may be raised against the above mentioned consideration is that the acid may not produce acidosis immediately after its administration. It is well known that when some acids are introduced into the body or an excess of acid is formed in an organism, they first react with the so called "Alkali reserve," forming sodium salt, free carbonic acid and monosodium phosphate which is very slightly acid. As carbonic acid and acid phosphate ionize only feebly, the change of blood pH by acid can be maintained at the normal limit. On the other side, the respiratory centre, which is very susceptible to acid stimulation, endeavours to drive out more CO_2 from blood with the consequence that the lowering of blood pH is prevented (Scott 1913, Collip 1920, Hooker 1917). These mechanisms protect the organism against acidosis to a certain extent. As long as the body is still

able to replace the reduced buffer substances in blood, the blood may remain without any appreciable alteration of blood pH. Thus no pronounced change in the blood reaction may occur in the earlier stage of acid administration. When all kinds of buffers have been used up, then it must ask for other aids to keep the blood in the ordinary reaction. It is generally admitted that chloride gives up in such a circumstance some of its base forming HCl which can migrate into corpuscles with concomitant production of sodium bicarbonate in plasma. That such weak acids as protein and CO_2 are able to displace such a strong acid as HCl seems to us to be hardly comprehensible. This process, however, has long been admitted to occur actually.

When we take these circumstances into consideration, it may be somewhat precarious to attribute the hyperchloremia in plasma to acidosis itself.

According to Peter and his coworker (1926), any diminution of plasma chloride without a corresponding loss of base liberates base to combine with carbonic or other acid, and tends to prevent excessive acidity and to promote a state of alkalosis. Vice versa, the passage of Cl from the tissues to the blood has the opposite effect. The base in tissues presumably releases or takes up Cl and like that in blood cell is thus rendered available for the maintenance of the reaction of plasma and the general exchange of electrolytes throughout the body.

In brief, they assume that the Cl content of blood is governed by, or relates to, the base in the tissues, that is, the increment of Cl in the blood indicates the liberation of more available base from the tissues for the maintenance of plasma reaction.

If these assumptions are true, the initial increment of plasma chlorine after the acid administration may be attributed to the mechanism that the tissues release chloride to blood in order to liberate more alkali for regulating the blood reaction.

As is stated above, it seems unreasonable to presume before determining the blood pH that the incipient rise of chlorine content

of plasma is due to acidosis itself. But it is likewise incomprehensible that the incipient hyperchloremia of blood and plasma may occur without any appreciable variation of blood reaction, while obviously the hyperchloremic state of corpuscles can be found.

As has been mentioned already, the facts have been proved certainly that acidosis causes the migration of Cl from plasma into corpuscles, and the increase in acid-combining power or in amount of bicarbonate of plasma. These facts, however, do not prove the formation of NaHCO_3 from NaCl in plasma that is generally taken as a process of controlling the blood reaction against acidosis. Indeed the chloride-shift is really a phenomenon which is caused by acidosis or asphyxia. But to admit the assumption that the chloride-shift follows the formation of NaHCO_3 by liberating Na from plasma chloride, and thus the blood can be maintained to a certain extent in nearly normal limit of variation without considerable alteration in blood reaction even if the available alkaline is consumed, at least the following factors must be experimentally ascertained. 1. The increase of HCl in corpuscles. 2. The alkali (Na) combined with NaHCO_3 , which is increased in plasma of acidotic or asphyxial blood, is liberated from NaCl in plasma, but not from other substances (hemoglobin, phosphate and protein etc.). These questions are not yet satisfactorily answered, and accordingly the assumption above mentioned is not more than a hypothesis at present.

On the other side it seems probable that, if the blood can gain more base by producing NaHCO_3 from neutral salt (NaCl) when the blood is treated with CO_2 or acid, the treated blood must have more buffer value as a whole than the untreated. Klothilde Meier (1922) has demonstrated that in the blood treated with high tension of CO_2 the amount of serum alkali increases, and that of serum chlorine diminishes, owing to the migration of Cl into the corpuscles. The accurate calculation of molar alkali-increase and of molar chlorine-diminution, and the comparison of both of these values revealed, however, that the amount of alkali,

which is allowed to combine CO_2 , is larger than that of alkali which is freed from NaCl by the chlorine-migration, and he attributed this to the alkali release from corpuscles into serum. Regarding this point, the close investigation made by Van Slyke and his coworker (1922) seems to us quite significant. According to their investigation, in the oxygenated blood the hemoglobin has 76,0 percent of the total buffer value, and bicarbonate 6,9 percent, the total value being 82,9. In the reduced blood (treated with CO_2) the figures are 73,3 and 9,0 percent, respectively (total 82,3). This indicates obviously that the buffer value of blood is depleted when the latter is reduced. They attribute the difference in buffer value between the oxygenated and reduced blood to a loss of buffer value at given pH when oxyhemoglobin is reduced. The consequent loss to the total buffer value of blood is only partially compensated by the increase in BHCO_3 (2,1%) that accompanies deoxygenation.

This increase in BHCO_3 or in alkali, however, can not be ascribed to NaCl in respect to its origin. According to Van Slyke, the oxygenation affects only the amount of base, bound by carbonic acid and hemoglobin, and whatever base is detached from combination with hemoglobin, it is represented by the increase of BHCO_3 , and vice versa. The increase in buffer value of BHCO_3 (2,1%) must, therefore, be taken as being due to the alkali (Na) detached from hemoglobin, but not from the other substances. Hence the increase in buffer value of BHCO_3 in the reduced blood, has nothing to do with other substances except hemoglobin.

This experimental result seems to deny indirectly the assumption that the BHCO_3 -production from plasma chloride is caused by the chloride-shift.

If such really be the case, the initial increase in the amount of blood or plasma-chlorine after the acid administration or asphyxiation must have nothing to do with the BHCO_3 -formation, in other words with the regulatory mechanism of blood reactions.

At all events, it is quite probable from my experiments that

by acid administration the buffer substances must first be partly given off, and consequently the blood reaction gradually tends to lean towards the acid side and finally reveals the condition of actual acidosis. It is, therefore, possible to take the initial increment in amount of plasma chlorine as a proper appearance which always precedes the hypochloremia in acidosis, especially in acute experimental acidosis.

These experimental facts suggest with great certainty that acid administration results first in the transfer of chlorine from tissues to blood, causing hyperchloremia in the whole blood with concomitant interchange of Cl between plasma and corpuscles. The transfer of tissue chlorine into blood will stop at a certain point, due probably to disturbance of the circulation and osmotic pressure, while the interchange of Cl between plasma and corpuscles can continue longer in the circulatory system corresponding to the existing alteration in acidity of plasma similar to the cases which may occur in the test tube. Thus the plasma chlorine which has increased in amount temporarily tends to decrease due to the migration of Cl from plasma into corpuscles, finally reaching a subnormal value. For this reason, if the death of animals happens too quickly (within about one hour after the administration of acid), we find hyperchloremia of plasma, while in cases where the animals survive longer, the chlorine content of plasma will be subnormal.

SUMMARY.

The results of my investigation may be summarized as follows.

1. The acid administration provokes hyperchloremia in the whole blood, already within about 10 minutes.
2. The chlorine content of corpuscles begins to increase already within about 15 minutes after the acid administration, and the corpuscular hyperchloremia is so regular that it may be regarded as a reliable indication of acidosis.
3. In animals to which acid has been administered, the

chlorine content of plasma decreases after an initial increment. If too much acid is given, the animal dies too quickly before the plasma chlorine begins to decrease.

It is for this reason that we find sometimes hyper- and sometimes hypochloremia of plasma in the blood of animals that have died from acid administration.

4. When a small sublethal dose of acid is employed, the chlorine content of plasma never falls below the normal level. It increases gradually and reaches the highest value within about 3 hours after acid administration, and then gradually falls until the normal value is again attained within about 5-6 hours.

5. As is described in the previous paper, acute suffocation results constantly in the increment of chlorine content of whole blood and corpuscles. The plasma chlorine also increases in amount up to the death, and then diminishes postmortally and finally reaches a subnormal value. Such is also the case with prolonged asphyxia except that the chlorine content of plasma becomes subnormal, already before the death of the animals.

Now we see that these changes in the chlorine content of whole blood, erythrocytes and plasma observed in the case of asphyxia, are seen also in animals to which acid has been administered. If the animal survives asphyxia or acidosis relatively long the hypochloremia of plasma always becomes manifest, while hyperchloremia of plasma are met in cases where the animals have died too quickly from asphyxia or acidosis in the stadium of initial increase of chlorine content. We think that our present work throws some light on the rôle of asphyxial acidosis in the chlorine interchange during asphyxiation.

REFERENCES.

- Akiya Minoru (1924): *Z. f. Klin. Med.*, **109**, 312.
Blum (1929): *Kongresszentralblatt f. die ges. Inn. Med.*, **50**, 194.
Birrel u. Cruicksbank (1924): *Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med.*, **34**, 147.
Bulger (1926): *Journ. of Clin. inves.*, **2**, 213.

- Benard (1929): Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med., **54**, 586.
Collip (1921): Journ. of Biol. Chem., **46**, 61.
Collip (1920): „ **54**, 58.
Doisy and Eaton (1921): Journ. of Biol. Chem., **1**, 684.
Dautrebande (1922): Journ. of Physiol., **57**, 36.
Eisenmann, Harold, Burger and Peter (1926): Journ. of Biol. Chem., **67**, 157.
Gürber (1895): cited from Journ. of Biol. Chem., **46**, 61, (1921).
Humburger (1892): Zeitschr. f. Biolo., **28**, 405.
Humburger (1918): Biochem. Zeitschr., **86**, 309.
Haggard and Henderson (1920): Journ. of Biol. Chem., **14**, 189.
Hasselbalch and Warburg (1918): Biochem. Zeitschr., **86**, 410.
Heilmeyer (1927): Deutsch. Arch. f. Klini. Med., **156**, 200.
Hooker, Wilson and Cennett (1917): Amer. Journ. Physiol., **43**, 351.
Joffe and Poulton (1920-1921): Journ. of Physiol., **54**, 129.
Klothilde Meier (1922): Klini. Woch. Schr., **1**, 1748.
Landau, Glass u. Kaminer. (1929): Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med., **55**, 47.
Limbeck (1894-1895): Arch. exp. Path. u. Pharm., **35**, 309.
Mainzer, Fritz u. Joffe (1928): Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med., **59**, 429.
Porter, Burger, Eisenmann and Leo (1926): Journ. of Biol. Chem., **67**, 175.
Peter, Bulger and Eisenmann (1926): Journ. of Biol. Chem., **9**, 165.
Salvesen, Harold, Hasting u. Intosh (1924): Journ. of Biol. Chem., **64**, 327.
Salvesen (1928): Z. f. Klin. Med., **109**, 302.
Schwarz u. Schmid (1928): Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med., **53**, 228.
Snapper (1913): Biochem. Zeitschr., **51**, 62.
Straub and Meier (1918): Biochem. Zeitschr., **89**, 156.
Scott (1913) Journ. of Physiol., **56**, 123.
Takeshi Saso (1930): Journ. of Biochem., **12**, 161.
Thiers (1929): Kongresszentralblatt f. d. ges. Inn. Med., **54**, 586.
Toyota Sakae (1927): Tokyo Igaku Zasshi, **41** 837.
Van Slyke and Cullen (1917): Journ. of Biol. Chem., **30**, 286.
Van Slyke, Hasting, Heiderberger and Neill (1922): Journ. of Biol. Chem., **54**, 481.

ÜBER DEN EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF GLYCEROPHOSPHATASE II.

VON

HIROSI TAKATA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama,
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu)

(Eingegangen am 10. Juni, 1931)

Im Jahre 1911 haben Harden u. Young beobachtet, dass die alkoholische Gärung durch Hefepressaft oder Trockenhefe durch Zusatz von Alkalienphosphat beschleunigt, und dabei die mit Magnesiamischung fällbare Phosphorsäure vermindert wird. Aus dem Gärgut haben sie Hexosephosphorsäure isoliert und daraus geschlossen, dass die Hexosephosphorsäure eine Zwischenstufe des Zuckerabbaues sei. Euler und seine Mitarbeiter (1911) haben durch ihre zahlreichen Untersuchungen des Hefeenzymes gefunden, dass bei der Gärung ein Coferment, das die Phosphorylierung des Zuckers vermittelt, eine grosse Rolle spielt. Dieses wurde von ihnen Phosphatase genannt.

Vor einiger Zeit hat Bodnár (1925) bei Erbsensamen beobachtet, dass im Erbsensamen ein phosphorylierendes Enzym vorhanden ist. Was die synthetische Wirkung der Glycerophosphatase betrifft, so wurde sie von vielen Autoren wie Nemeč (1928), Kay (1928), Martrand u. Robison (1927) und Suzuki u. Maruyama (1930) eingehend untersucht, obwohl es noch unbekannt ist, ob das synthetisierende Ferment dieselbe Glycerophosphatase ist. Kay hat aus der Schleimhaut des Duodenums ein synthetisierendes Ferment extrahiert und aus dem Reaktionsgemisch als Bariumsalz eine Glycerinphosphorsäure isoliert. Martrand u. Robison haben die Knochenphosphatase studiert und gefunden, dass bei Knochenphosphatase durch Zusatz von hoch konzentrierter Glycerinlösung eine stärkere Phosphorylierung

auftritt. Suzuki u. Maruyama haben mittelst Einwirkung von Taka-Phosphatase auf eine Lösung von Glycerin und Phosphorsäure 2 Arten von Glycerinphosphorsäure (α Form und β Form) isoliert.

In der vorigen Mitteilung habe ich berichtet, dass die Wirkung der Glycerophosphatase von der Niere und der Leber durch Gallensäure deutlich gehemmt wird. Neuerdings hat Uraki(1931) beobachtet, dass die Phosphatesewirkung der Leber, der Niere und des Muskels durch Zusatz von Cholsäure beschleunigt wird. Diese die Phosphorylierung zwischen Zucker und Phosphorsäure durch Phosphatase beschleunigende Wirkung der Cholsäure geht nach ihm mit der Menge der zugesetzten Cholsäure fast parallel.

Obwohl das Vorhandensein von Gallensäure im normalen Blut noch nicht feststeht, so ist doch sicher, dass die Gallensäure durch den enterohepatischen Kreislauf in die Leber gelangt und wenigstens bei Stauungsikterus durch Rückfluss der Galle im Blut zirkuliert. In diesem Sinne ist es von grosser Bedeutung, die Synthese und die Spaltung der Glycerinphosphorsäure im Organ zu erforschen. Besonders interessant ist es, wenn man berücksichtigt, dass die Zufuhr von Gallensäure nach Tsuji (1931) den Lipoidgehalt der Leber von Kaninchen vermindert, der bekanntlich teilweise aus Glycerinphosphorsäure besteht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Die Fermentlösung wurde in genau der gleichen Weise, wie in der ersten Mitteilung angegeben, bereitet: der Brei vom Organ wurde bei der Leber mit der fünffachen Menge von Chloroformwasser, bei der Niere mit der zehnfachen Menge desselben durchgerührt, 2 Tage lang im Brutschrank bei 37° C autolysiert und 2 Tage lang in fließendem Wasser dialysiert. Dieses Dialysat wurde als Fermentlösung zum Versuch verwendet.

Als Substrat wurde nach Nemec und Kay eine 50 %ige (Volum) Glycerinlösung und das Sörensensche Phosphatgemisch von pH=8,4 zum Versuch gebraucht. Die Versuchsanordnungen sind in der folgenden Tabelle zusammen angegeben.

TABELLE I.

		A	B	C	D	E
1 % Cholatlös.	cem	0	1	3	5	0
Phosphatgemisch	cem	5	5	5	5	5
Glycerinlös.	cem	20	20	20	20	20
Fermentlös.	cem	10	10	10	10	0
Gekochte Fermentlös.	cem	0	0	0	0	10
Wasser	cem	5	4	2	0	5
Toluol	cem	2	2	2	2	2

Das Reaktionsgemisch wurde im Brutschrank bei 37° C 96 Stunden stehen gelassen, mit 10 cem einer 5 %igen Trichloressigsäurelösung versetzt und dann abfiltriert. Von 20 cem Filtrat wurde die Phosphorsäure genau so, wie in der ersten Mitteilung angegeben, bestimmt. Die in der Tabelle angegebene Zahl zeigt den mg %igen Phosphorgehalt. Die Resultate sind in den Tabellen II und III angegeben.

1. Versuch mit Niere.

Aus der Tabelle II ist ersichtlich, dass die Synthese der Glycerinphosphorsäure mit Nierenphosphatase im allgemeinen durch Zusatz von Cholsäure gesteigert wird. Diese gesteigerte synthetische Wirkung geht fast parallel mit der Menge der zugesetzten Cholsäure, obwohl die Steigerung der Synthese der Glycerinphosphorsäure je nach dem Gehalt der Lösung an Cholsäure ganz verschieden ist. Wenn wir den mit ausgekochter Fermentlösung als Kontrolle ausgeführten Versuch betrachten, so sehen wir die Synthese der Glycerinphosphorsäure bei Abwesenheit von Cholsäure durchschnittlich mit 6,77% angegeben. Bei 0,025%igem Gehalt an Cholsäure zeigt sie sich durchschnittlich mit 6,80%, bei 0,075%igem mit 7,34% und bei 0,125%igem mit 7,55%.

TABELLE II.

Nr. des Versuchs:	Versuchsreihe:				
	A	B	C	D	E
1	17,119	17,229	17,842	17,114	18,725
2	17,063	17,174	17,285	17,063	18,891
3	17,285	17,174	17,229	17,285	18,891
4	17,396	17,340	17,229	17,174	18,670
5	17,396	17,313	17,285	17,285	17,894
6	17,119	17,119	16,842	16,732	18,227
7	17,728	17,728	17,673	17,451	18,615
Durchschnittswert:	17,301	17,296	17,196	17,157	18,559
% iger Wert der Synthese:	6,77	6,80	7,34	7,55	
Gehalt an Natr. Cholat. (%):	0	0,025	0,075	0,125	

2. Versuch mit Leber.

Aus der Tabelle III ersieht man, dass die Synthese von Glycerinphosphorsäure in der Leber durch Zusatz von Cholsäure im allgemeinen gefördert wird, und dass bei Abwesenheit von Cholsäure der synthetische Wert durchschnittlich mit 5,23%, bei 0,025%igem Gehalt an Cholsäure mit 5,35%, bei 0,075%igem mit 5,50% und bei 0,125%igem mit 5,82% gezeigt wird. Also wird auch hier die Synthese der Glycerinphosphorsäure mit der Menge der zugesetzten Cholsäure fast parallel gesteigert. Die Synthese der Glycerinphosphorsäure in der Leber tritt sowohl mit, als auch ohne Zusatz von Cholsäure viel schwächer auf als die in der Niere. Bekanntlich ist in der Niere mehr Glycerophosphatase als in der Leber enthalten. Die Synthese der Glycerinphosphorsäure tritt

in der Niere stärker als in der Leber auf.

Aus diesen Tatsachen scheint mir hervorzugehen, dass in der Niere mehr Glycerophosphatase als in der Leber enthalten ist, was eine vermehrte Synthese in der Niere zur Folge hat, wenn die Synthese und Spaltung der Glycerinphosphorsäure durch dasselbe Ferment Glycerophosphatase vermittelt wird. Meines Erachtens wird die Synthese und die Spaltung der Glycerinphosphorsäure durch dasselbe Ferment, Phosphatase, vermittelt und stellt eine Verschiebung des Gleichgewichtszustandes dar, weil die Synthese der Glycerinphosphorsäure und die die Synthese fördernde Wirkung der Cholsäure in der Niere viel stärker als in der Leber auftritt, genau wie es bei der durch Phosphatase in der Niere und Leber verlaufenden Spaltung der Glycerinphosphorsäure der Fall war. Die Spaltung der Glycerinphosphorsäure durch Phosphatase wurde durch die Gallensäure sowohl bei der Leber als auch bei der Niere stark gehemmt, jedoch war die hemmende Wirkung bei der letzteren stärker als bei der ersteren. In diesem Sinne ist es von Bedeutung, den Einfluss der Gallensäure auf die Knochenphosphatase zu erforschen, weil als Quelle der Harnphosphorsäure die anorganischen Salze des Körperknochens hauptsächlich in Betracht kommen. Bekanntlich sind die Niere und die Leber Ausscheidungsorgane der Phosphorsäure, und es wurde auch durch die Untersuchungen von Kawada (1931), Hatakeyama (1927), Sekito (1929) und Fujiwara (1931) bewiesen, dass die Zufuhr von Gallensäure oder der experimentelle Choledochusschluss bei Kaninchen eine vermehrte Ausscheidung von Phosphorsäure im Harn herbeiführt. Diese Autoren haben dabei erklärt, dass die vermehrte Phosphorsäure in Harn auf dem dadurch gesteigerten Nucleinstoffwechsel beruht.

Auch um das Wesen der Phosphorsäurevermehrung im Harn klarzustellen ist es von Interesse, die Wirkung der Gallensäure auf die Knochenphosphatase zu erforschen.

TABELLE III.

Versuchsreihe: Nr. des Versuchs:	A	B	C	D	E
1	16,842	16,842	16,675	16,509	17,673
2	16,537	16,592	16,509	16,509	17,285
3	16,620	16,620	16,620	16,675	18,055
4	17,119	17,119	17,008	17,063	18,116
5	17,728	17,728	17,728	17,617	18,891
6	17,504	17,504	17,504	17,562	18,725
7	17,839	17,673	17,839	17,673	18,004
Durchschnittswert:	17,168	17,146	17,119	17,063	18,116
% iger Wert der Synthese:	5,23	5,35	5,50	5,82	
Gehalt an Natr. Cholat: (%)	0	0,025	0,075	0,125	

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Synthese der Glycerinphosphorsäure in der Leber und der Niere wird durch Zufuhr von Cholsäure gefördert. Diese Förderung geht mit der Menge der zugesetzten Cholsäure fast parallel.

2. Die die Synthese der Glycerinphosphorsäure fördernde Wirkung der Cholsäure tritt in der Niere stärker auf als in der Leber.

LITERATUR.

- Bodnár, J. (1925): Bioch. Zeitschr., **165**, 1.
 Euler, H. u. Kullberg, S. (1911): Zeitschr. f. physiol. Chem., **74**, 15.
 Fujiwara, K. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 43.
 Hården, A. u. Young, W. J. (1911): Bioch. Zeitschr., **32**, 173.
 Hatakeyama, T. (1927): Jl. of Bioch., **8**, 261.
 Kawada, Y. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 133

- Kay, H. D. (1928): *Bioch. Jl.*, **22**, 855.
 Marstrand, M. u. Robison, R. (1927): *Bioch. Jl.*, **21**, 665.
 Nemec, A. (1928): *Bioch. Zeitschr.*, **202**, 229.
 Suzuki, B. u. Maruyama, T. (1930): *Proc. Imper. Acad. Tokyo*, **6**, 67.
 Sekito, T. (1929): *J. of Bioch.*, **11**, 251.
 Uraki, Z. (1931): *J. of Bioch.* **14**, 123.

BIOCHEMICAL STUDIES ON HYDROCYANIC ACID.

VII. On the Cause of Hydrocyanic Acid Hyperglycemia.

By

FUMIO KUDO.

(From the Department of Medical Chemistry of the Manchuria Medical College, Mukden. Director: Prof. Dr. S. Toda.)

(Received for publication, June 11, 1931)

Various views on the causative factors of hyperglycemia in asphyxie have been published. Cannon and Hoskin (1911) and Anrep (1912) held that dyspnea or asphyxia reacts upon the suprarenal capsules in such a manner as to accelerate their functions and that hyperadrenalinemia is thus produced, which in turn results in hyperglycemia.

K. Yamakami (1919) experimentally transfused the blood of the rabbit in asphyxia into the normal rabbit and thus produced hyperglycemia and suggested that the adrenalin in the asphyxic blood might play the most prominent part in the production of hyperglycemia. H. Tachi and S. Saito (1928) proved the fact that hyperglycemia developed in the rabbit into which the asphyxic blood had been transfused, but they did not have data enough to prove any quantitative changes in the adrenalin contents of the blood.

It is known that in prussic acid poisoning, difficult respiration and the resultant asphyxia are the most pronounced symptoms. Some papers concerning the quantitative changes in the blood sugar contents during these processes of poisoning, are available in literature, with the exception of the paper by Yano and Kirita (1926), who experimented on the rabbits which they caused to inhale prussic acid gas directly, and such authors as Tatum and Atkinson (1922), C. Kawamura (1928), F. Kudo (1930), Oda

(1929), etc., proved the fact that in prussic acid poisoning, hyperglycemia always developed.

Two phases might be considered in the production of hyperglycemia in prussic acid poisoning; it might be produced by Geppert's (1889) so-called internal asphyxia and by simple suffocation or by simple deficiency in oxygen supply. Whether or not hyperglycemia, if it should develop in both these forms of asphyxia after all, from these two different phases of asphyxia might be the same is still to be determined.

In my attempt to determine the cause of prussic acid hyperglycemia, investigations were carried out to make clear the connection between prussic acid hyperglycemia and the functions of the suprarenal capsules, and to estimate the quantitative changes of the adrenalin contents of the blood in acute poisoning from prussic acid.

METHODS.

Experimental Animals:—Both Chinese and Japanese rabbits were employed. For some tens of days before the experiment, they were fed on routine ration consisting of "Okara" (i.e. bean-bran or the by-products of bean curd) and green vegetables. For at least 24 hours before the commencement of the experiment, however, they were kept starved.

Estimation of Blood Sugar:—Bang's new method was adopted. The blood for test purposes was collected from the auricular vein. The test was repeated thrice with each batch of the blood and the average of these three tests was found.

Prussic Acid:—An injection was made hypodermically into the back with a dose of 1.3 mg. per 1 kilogram body-weight. In the case of the suprarenaetomized animals, however, the hypodermic injection consisted of 1.0–1.2 mg.

The poison consisted of the watery solution of desicated chemically pure potassium cyanate. It was prepared by the following method. 0.65 grm. of potassium cyanate was weighed and

dissolved in 50 c. cm. of distilled water. To the solution was then added 50 c. cm. of an N/5 hydrochloric acid solution in order to make the total amount of the solution of 100 c. cm. 1.0 c. cm. of the solution contained 2.6 mgr. of hydrocyanic acid by calculation.

Blood was withdrawn several times after the injection, allowing certain intervals between each withdrawal, and quantitative analyses were made. The adrenalin-like substances in the blood were quantitatively estimated by Chikano's method (1926).

The adrenalin content of the blood was estimated by the method described by Teh-jun Yen (1930), which consisted of a slight modification of Loewen-Trendelenburg's method.

The toad preparation employed in my experiments was made with the "autumn frog", thriving in the vicinity of Mukden. Two sorts of Ringer's mixtures (See Table I), i.e. the summer

TABLE I.
Composition of nutrition fluids.*

Composition \ Perfusion solution	Summer-solution	Winter-solution
NaCl	0.65 gm.	0.6 gm.
KCl	0.005 "	0.03 "
CaCl ₂	0.025 "	0.02 "
NaHCO ₃	0.02 "	0.02 "
H ₂ O	in 100 cm.	in 100 cm.
pH	7.48	7.76

* R. Kolm and E. P. Pick, Arch. f. d. ges. physiol., 1921, Bd., 189, p. 139.

and the winter, containing 0.2% of citrate, were allowed to perfuse through the lower leg vessels and to drop upon the tumbler by means of a glass capillary inserted into the abdominal vein. The number of drops was counted by means of a rubber tube connected to an ear-piece and to the tumbler and the count was recorded on section paper.

The *test fluid* was prepared by the following method. Into 0.2 c. cm. of the blood collected before and after asphyxia, 0.6 c. cm. of a 4.0% citrate solution and then 0.2 c. cm. of a 0.2% citrated Ringer's mixture were added so that the entire amount of the liquid reached 1.0 c. cm., 0.3 c. cm. of this mixture was injected into the vein at the point directed by Teh-jun Yen by means of a syringe so as to allow the test fluid to perfuse together with the perfusion liquid. The strength of the contraction was estimated by the numerical changes of the drops. The standard adrenalin solutions were prepared with the same medium as the perfusion fluid of several different concentrations. Into 0.2 c. cm. of each sort of this standard solution was added 0.2 c. cm. of normal blood and then 0.6 c. cm. of a 4.0% of the citrated solution, 0.3 c. cm. of these five times diluted standard adrenalin solutions was allowed to perfuse together with the perfusion fluid as the test fluid was made to perfuse through the vein of the frog and the number of the drops was counted.

The results of these two tests were compared and the concentration of adrenalin in the asphyxic blood was determined indirectly.

The withdrawal of the blood was carefully made and the perfusion experiment was made within as short interval as possible.

RESULTS OF THE EXPERIMENTS.

1. *Changes of the Blood Sugar Contents by Hydrocyanic Acid injected after two and a half Hours from the Curetting the Medulla of the Suprarenal Capsules.*

As can be seen from table II Pronounced by hyperglycemia developed after curetting, in which case the maximum hyperglycemia occurred after $\frac{1}{2}$ hour. It decreased gradually, however, and after two or three hours, the normal blood sugar contents were restored. During the experiment, most of the animals died in an

TABLE II.
Changes of the Blood Sugar Contents by Hydrocyanic Acid injected after
two and half hours from the Oureting the Medulla of the
Suprarenal Capsules. The Results

Datum	No. of Experi- ments	Body weight (gm)	Race and sex	Blood-Sugar contents (%)											
				Before the operation	After the operation										
					Before the injection				Injected amount of HCN pro 1kg of body weight (mg)	After the injection					
					30 m. after the opera.	1 h. 30 m.	1 h. 30 m.	2 h. 30 m.		30 m. after of inject.	1 h.	30 m. 1 h.	3 h.	4 h.	
1930 III. 28	1	1400	(C) ♂	0.089	0.138	0.130	0.118	—	1.1	0.117	—	—	—	—	
29	2	2800	(J) ♂	0.086	0.125	0.120	0.117	0.095	1.1	0.098	—	0.086	—	—	—
30	3	2200	(C) ♂	0.098	—	0.150	—	—	1.1	0.155	0.146	0.147	0.085	—	0.070
IV. 2	4	1600	(C) ♂	0.091	—	0.155	—	—	1.1	0.135	0.095	0.093	—	—	—
3	5	2400	(J) ♀	0.104	0.171	—	0.145	0.14f	1.2	0.153	—	—	—	—	—
4	6	2700	(J) ♀	0.074	0.210	0.201	—	—	1.2	0.134	0.155	—	0.122	—	—
5	7	2200	(J) ♀	0.084	0.230	0.191	—	—	1.2	0.200	0.200	—	—	—	—
7	8	1300	(C) ♂	0.092	0.240	—	—	—	1.2	0.250	0.240	0.210	—	—	—

TABLE III.
The Results of the Control Experiments of Experiment 1.

Datum	No. of Experi-ments	Body weight (mg)	Rael and sex	Blood-Sugar contents (%)									
				Before the operation	Before the injection				Injected amount of HCN pro 1kg of body weight (mg)	After the operation			
					30 m. after the operation	1 h. 30 m.	1 h. 30 m.	2 h. 30 m.		30 m. after the injection	1 h. 30 m.	1 h. 30 m.	3 h. 4 h.
1930 IV. 9	9	1560	(C) ♂	0.098	0.152	0.174	0.138	—	1.2	0.097	0.140	0.164	0.125 —
10	10	1700	(C) ♂	0.088	—	0.228	0.185	—	1.2	0.208	0.213	0.214	0.200 0.160
11	11	1420	(C) ♂	0.083	0.165	—	—	—	1.2	0.115	0.106	0.135	0.165 0.150
12	12	1600	(C) ♂	0.118	0.158	0.242	0.190	—	1.2	0.210	0.195	0.205	0.212 0.195

hour and a half after the injection. Case 3 alone liver for above four hours after the injection. (In the Table, the following symbols are used: a (J) stands for the Japanese rabbit and a (C) the Chinese rabbit).

In Table III, the results of the control experiments are shown. The animals were laparotomized and after certain hours the operation wound was sutured. Prussic acid was injected two and a half hours after the saturation. In these cases, all the animals survived. Hyperglycemia also developed after half an hour and after a gradual increases in the blood sugar contents, the maximum was reached three hours after the injection, in the same manner as in the poisoning of normal animals. From the results of the above described series of experiments, it will be seen that prussic acid hyperglycemia and the suprarenal capsules have an intimate connection with each other.

2. *On the Changes in the Blood Sugar Contents by Hydrocyanic Acid injected Several Days after Curetting the Medulla of the Dextral Suprarenal Capsules and Resection of the Sinister Splanchnic Nerves.*

In order to eliminate the psychical and other influences arising from the curetting, the injection of prussic acid was made one week after the operation. The results are shown in Table IV. (Experiment 4 is also entered in the same Table). A quantitative increase of blood sugar was observed to take place half an hour after the injection. However, it decreased as in the case of the former experiments.

In my former experiments (Kudo, 1930), in which the bilateral splanchnic nerves of the experimental animals were resected, no marked hyperglycemia was observed. I therefore reported that hyperglycemia in prussic acid poisoning must be or might be central nervous in nature. C. Kawamura (1928) and Yano and Kirita (1926) held similar views. From the results of the present experiment, however, it seems more natural to re-

TABLE IV.
The Results of the Experiment 2 and 4.

Datum	No. of experiments	Body weight (gm)	Rael and sex	Injected amount of HCN pro 1kg of body weight (mg)	Experimental matters	Before the HCN-Injection	After the HCN-Injection				
							30 m.	1 h.	1 h. 30 m.	3 h.	6 h.
1930 IV. 22	13	1410	(C) ♀	1.1	{ Blood-sugar (%) Adrenalin-substances in 0.5 cm. of Serum (mg) }	0.070	0.090	—	0.065	0.061	—
							0.0166	—	—	0.0155	—
24	17	1270	(C) ♀	1.1	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.135 0.0160	0.175 0.0230	0.140 0.200	0.150 —	— —	— —
							0.175 0.0232	— —	— —	— —	0.095 0.0175
28	21	1400	(C) ♀	1.1	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.063 0.0149	0.080 0.0220	— —	0.068 —	0.090 0.0220	0.083 —
							0.130 0.0200	— —	0.075 —	0.080 0.0150	0.078 —
V. 1	23	1500	(C) ♀	1.1	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.082 0.0149	0.130 0.0200	— —	0.075 —	0.080 0.0150	0.078 —

gard the hyperglycemia occurring in prussic acid poisoning as not being the result of an acceleration of the function of the liver or, or rather, of the hepatic cells, as the impulse from the central nervous system stimulated them when the effect of the poisonous action of prussic acid was transmitted through the sympathetic nerves. It is more probable that the impulse from the central nervous system accelerated the functions of the suprarenal capsules and caused a quantitative increase of adrenalin in the blood, which in turn caused hyperglycemia.

Were, then the adrenalin contents of the blood increased by the prussic acid poisoning? In order to answer this question, the following experiments were carried out.

3. *Quantitative Changes in the Blood Sugar in the Rabbit into which the Asphyxic Blood of the Rabbit was transfused through the Auricular Vein.*

In the method given in the experimental reports by Yamakami (1919) and Tachi and Saito (1928), described above, asphyxic blood of the rabbit in prussic acid poisoning was transfused into the auricular vein of the normal rabbit and the blood sugar contents were quantitatively estimated.

The results of the experiment fluctuated, because, although in some cases a quantitative increase of blood sugar contents could be observed, there were some in which no quantitative increase of blood sugar developed, while in others was even a decrease.

Another series of experiments was tried in which 7 cc.–10 cc. of the asphyxic blood of the rabbit were injected into the inguinal vein of rabbits weighing ca. 1.5 kilogram. The blood pressure of the injected rabbits was examined at the carotic aorta. No noticeable changes occurred.

4. *Quantitative Changes of Adrenalin-like Substances in the Blood in Acute Prussic Acid Poisoning.*

Prof. Y. Kotake (1924) and his followers held the view that

amino acids and their decomposition products are closely connected with hormone and exert an important influence on organic functions. Abderhalden (1924) and other investigators proved that a trace of amino acids increased the action of adrenalin. Amino acids and their decomposition products are very closely related chemically to adrenalin, and moreover they have a very closely related physiological action. If so, the changes in the quantitative contents of these bodies in the blood must play an important part in prussic acid hyperglycemia; therefore, the changes of the blood contents of these adrenalin-like substances were tested.

The experimental results are shown in Table V. Half an hour after the injection of prussic acid, their contents were seen to increase to ca. 0.025 mg per 0.5 cc. of the serum from ca. 0.012 mg of the normal serum. A gradual decrease then began to develop. Table IV shows the results of the quantitative changes of the adrenalin-like bodies in the blood caused by the injection of prussic acid after an elapse of one week from the curetting of the medulla of the dextral suprarenal capsule and the resection of the sinister splanchnic nerve. In this case, a remarkable increase of the adrenalin-like bodies developed half an hour after the injection of prussic acid. A gradual decrease ensued. In comparing these two tables, it will be seen that in the former case, the quantitative increase of adrenalin-like bodies seems the more remarkable, but a closer observation reveals no great difference between them. The suprarenal capsules do not seem to be responsible for the quantitative increase of adrenalin-like bodies in prussic acid poisoning.

5. Changes in the Concentrations of Adrenalin in Blood.

When in half to one-third of an hour after the injection of prussic acid, i.e. immediately after the onset of serious symptoms of poisoning, the asphyxic blood was perfused through the vessels of the lower legs of the bufo, a slight increase of the number of drops was observed to take place. This might prove that in acute poisoning from prussic acid, in which a severe dyspnea and

TABLE V.
The Results of the Experiments 4.

Datum	No. of experiments	Body weight (gms)	Race and sex	Injected amount of HCN per 1kg of body weight (mg)	Experimental matters	Before the HCN-injection	After the HCN-injection				
							30 m.	1 h.	30 m. 1 h.	3 h.	6 h.
1930 IV. 15	14	1500	(C)	1.3	{ Blood-sugar (%) Adrenalin-substances in 0.5 cm. of serum (mg.) }	0.081	0.158	—	0.145	—	0.125
						0.0100	0.0166	—	0.0132	0.0120	—
16	15	1300	(C)	1.3	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.094	0.115	0.155	0.175	0.185	0.210
						0.0148	0.0267	—	0.0232	—	0.0165
17	16	1350	(C)	1.3	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.135	0.178	—	0.155	0.145	—
						0.0111	0.0241	—	0.0210	0.0195	—
18	19	1500	(C)	1.3	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.102	0.152	0.172	0.135	—	0.180
						0.0121	0.0262	—	0.0210	0.0182	0.0170
19	20	1600	(C)	1.3	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.087	0.081	—	0.090	0.100	—
						0.0159	0.0214	—	0.0180	0.0165	—
20	22	1400	(C)	1.3	{ Blood-sugar Adrenalin-substances }	0.119	0.175	—	0.150	0.135	0.120
						0.0121	0.0248	—	0.0220	—	0.0195

asphyxia developed, there occurred a quantitative increase of the substances which contracted the blood vessels—adrenalin.

In Fig. 1, the results of the perfusion experiment with the asphyxic blood (cases Nos. 1-4) and with the mixtures of normal blood and standard dilutions of adrenalin in various concentrations (cases Nos. 5-8) are compared. By these means, the adrenalin contents of a certain given amount of asphyxic blood may be estimated indirectly by reading the results of the number of drops, e.g., if a given asphyxic blood perfusion should yield the same number of drops, as those obtained by the perfusion of a certain concentration of adrenalin, the former might be considered to contain as much adrenalin as the standard solution contained.

In practice, however, this attempt to estimate the adrenalin contents of the asphyxic blood by this indirect method proved unsuccessful, because the results fluctuated widely. (In the experiment a large number of rabbits were employed, but in order to avoid the troublesome task of exhibiting a large number of practically identical results, only 8 cases are shown in the table). By the use of the arterial blood of the auricle, however, it was seen that the adrenalin concentration of the asphyxic blood increased to ca. 1:1000000-1:10000000. Moreover, it was observed that these concentrations of adrenalin tended to continue for 2-3 hours after the injection of prussic acid.

RÉSUMÉ.

It would be irrational to ascribe the cause of hyperglycemia in prussic acid poisoning entirely to the increase of the adrenalin contents of the blood, because even in the animals in which the medulla of the suprarenal capsules had been curetted off or the splanchnic nerves had been resected, hyperglycemia developed after the injection of prussic acid.

Although the experimental results showed that hyperglycemia in prussic acid poisoning might be due largely to the increased adrenalin contents of the blood, yet other causative factors, e.g. the

direct stimulus of the hepatic cells by the impulses occurring in the central nervous system and the incomplete incineration of sugar due to asphyxin, should not be disregarded. Above all, the quantitative increase of adrenalin-like bodies in the blood, which can hardly be considered to have much connection with the functions of the suprarenal capsules, is believed to be closely concerned in the production of hyperglycemia by prussic acid poisoning. As Y. Kotake (1924) and Abderhalden (1924) believe, that, as certain kinds of amino acids or decomposition products of proteins augment the action of adrenalin, so in prussic acid poisoning, although there might be no marked increase of adrenalin secretion, yet the action of adrenalin had been augmented by the increased amounts of adrenalin-like substances and consequently hyperglycemia and the contraction of the blood vessels had been produced. Hyperglycemia, however, can never be produced simply by the action of the adrenalin-like substances, because in the rabbit from which the medulla of the suprarenal capsules had been removed there occurred a marked increase of adrenalin-like substances in its blood and yet there was no hyperglycemia.

CONCLUSION.

1. When the medulla of the suprarenal capsules of the rabbit had been curetted, the prussic acid glycemia was remarkably weak.

2. The chief cause of hyperglycemia by prussic acid poisoning is due largely to the quantitative increase of adrenalin developing from asphyxia. It was proved by Loewen-Trendelenburg's Toad-preparate-method, that the concentration of adrenalin in the blood was ca. 1:1000000-1:10000000 in prussic acid poisoning.

3. The increased contents of adrenalin-like bodies in the blood are greatly responsible for the hyperglycemia caused by prussic acid poisoning.

LITERATUR

Anrep (1912/13): *J. of Physiol.*, **45**, 318.

Abderhalden und Gelhorn (1924): *Pfüger's Archiv*, **206**, 154.

- Cannon and Hoskin (1911/12): *Am. J. of Physiol.*, **29**, 274.
 Chikano, M. (1926): *Osaka-Igakukai-Zasshi*, **25**, 205.
 Geppert (1889): *Z. f. Klin. Med.*, **5**, 208 u. 309.
 Kawamura (1928): *Kyoto-Ikadaigaku-Zasshi*, **2**, 155.
 Kudo (1930): *J. of Oriental Med.*, **13**, 413.
 Kotake, Y. (1924/25): *Nisshin Igaku*, **14**, 1965.
 Oda (1929): *F. Endocrinol. Jap.*, **5**, 393.
 Tachi and Saito (1928): *Tohoku J. of Exp. Med.*, **10**, 426.
 Tatum and Atkinson (1922): *J. of Biolog. Chem.*, **54**, 331.
 Teh-jun Yen (1930): *Tohoku J. of Exp. Med.*, **14**, 415.
 Yamakami, Y. (1919/20): *Am. J. of Physiol.*, **50**, 177.
 Yano and Kirita (1926): *Chugai Iji Shimpō*, **1110**, 810.

BEITRÄGE ZUR KENNTNIS DER HYPO- GLYKÄMISCHEN WIRKUNG DER GALLENSÄURE.

VON

KEIZO TANAKA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 12. Juni 1931)

Durch die Untersuchungen vieler Autoren, wie Fürth und Schütz (1907), Shoda (1926), Kaziro und Tsuji (1929) und Takeji Okamura (1930) ist bereits erwiesen, dass die physiologische Wirkung der Gallensäure mit ihrer chemischen Konstitution in innigem Zusammenhang steht.

Nach Shoda, Kaziro und Tsuji soll die OH- Gruppe im Gallensäuremoleküle für die fördernde Wirkung bei der Fettspaltung der Pankreaslipase unbedingt notwendig sein. Dieses Prinzip ist nach Takeji Okamura auch bei der fördernden Wirkung der Gallensäure für die Nuklease in der Leber und im Darm gültig.

Neuerdings haben nun Misaki (1927), Murakami (1928), Teiji Okamura (1928), Tsuji (1930) und Adlersberg und Róth (1927) nachgewiesen, dass die Gallensäure, Cholsäure, Desoxycholsäure, Dehydrocholsäure sowohl auf den nüchternen Blutzucker als auch auf die experimentell durch Zufuhr von Traubenzucker erzeugte Hyperglykämie herabsetzend wirken.

Um zu sehen, ob diese hypoglykämische Wirkung von dem Vorhandensein der sekundären Alkoholgruppen im Gallensäuremoleküle abhängig ist, habe ich den Einfluss der verschiedenen Gallensäuren: Dehydrocholsäure, Dehydrodesoxycholsäure, Cholan-säure, Cholatriensäure, Apocholsäure auf den nüchternen Blutzucker des Kaninchens untersucht.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurden gut ausgewachsene, kräftige, mittelgrosse Kaninchen verwendet, die 12–15 Stunden lang gehungert hatten und unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet worden waren. Nach Feststellung des Ausgangswertes des nüchternen Blutzuckers erfolgte die subkutane oder intravenöse Zufuhr der verschiedenen Gallensäuren, und danach wurde in kurzen Zeitintervallen der Verlauf der Blutzuckerkurve verfolgt. Die Blutzuckerbestimmung wurde nach dem neuen Verfahren von Bang ausgeführt.

1. Versuch mit Dehydrocholsäure.

Bei diesem Versuche wurden 2.0–4.0 ccm einer 1%igen Natriumdehydrocholatlösung pro kg Körpergewicht den Kaninchen, die 12–15 Stunden gehungert hatten, subkutan injiziert, und der Blutzuckergehalt in einem bestimmten Zeitintervall bestimmt. Aus der Tabelle I ist ersichtlich, dass die Zufuhr der Dehydrocholsäure bei 7 Versuchen ohne Ausnahme einen Abfall des Blutzuckers hervorruft, wie auch schon Adlersberg und Róth (1927) und Murakami (1928) in ihrem Versuchen bewiesen haben, und dass der Abfall des Blutzuckers im allgemeinen 3–4 Stunden nach der Zufuhr der Gallensäure eintritt, um nach 6–7 Stunden wieder den Anfangswert zu erreichen.

Die Herabsetzung des Blutzuckers beträgt etwa 17–38% des Ausgangswertes und tritt um so stärker auf, je mehr Dehydrocholsäure zugeführt wird. Diese Daten zeigen, dass der Grad des Blutzuckerabfalls bei Zufuhr von Dehydrocholsäure etwas deutlicher ist als bei der von Cholsäure, was schon von Murakami in seinem Versuch nachgewiesen wurde.

2. Versuch mit Dehydrodesoxycholsäure.

Unter genau den gleichen Bedingungen wie bei Dehydrocholsäure wurde der Einfluss der Dehydrodesoxycholsäure auf den

TABELLE I (Dehydrocholsäure).

Nr.	Körpergewicht in g.	Injizierte Dehydro- cholamenge in cem pro kg Körper- gewicht.	Blutzucker vor der Injektion in %:	Blutzucker nach Stunden: (%)							Prozentzahl des Blutzuckerabfalls aus dem Ausgangswerte:	
				$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	5	6		7
1	2350	2.0	0.110	0.114	0.101	0.098	0.091	0.093	0.102	0.114	0.112	17.2
2	2030	2.0	0.108	0.112	0.100	0.086	0.083	0.099	0.101	0.103	0.111	23.1
3	2250	2.5	0.102	0.109	0.096	0.091	0.085	0.078	0.089	0.097	0.104	23.5
4	1950	3.0	0.101	0.107	0.102	0.090	0.081	0.075	0.082	0.094	0.099	25.7
5	2420	3.5	0.117	0.112	0.106	0.091	0.083	0.082	0.099	0.104	0.114	30.0
6	1810	4.0	0.096	0.101	0.081	0.078	0.069	0.089	0.091	0.103	0.098	28.1
7	2380	4.0	0.116	0.119	0.108	0.102	0.091	0.072	0.089	0.104	0.117	38.0

nüchternen Blutzucker des Kaninchens bei subkutaner Zufuhr von 1.0–3.0 ccm einer 1%igen Natriumdehydrodesoxycholatlösung pro kg Körpergewicht geprüft. Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Bei allen 7 Versuchen mit Dehydrodesoxycholsäure wurde der Blutzuckergehalt ohne Ausnahme herabgesetzt, und zwar wurde eine 15–34%ige Herabsetzung des Ausgangswertes beobachtet. Diese Herabsetzung des Blutzuckers tritt auch 3–4 Stunden nach der Zufuhr der Dehydrodesoxycholsäure ein, und zwar in gleichem Grade wie bei Dehydrocholsäure. Dehydrocholsäure und Dehydrodesoxycholsäure sind bekanntlich Ketosäuren und enthalten in ihrem Moleküle keine sekundären Alkoholgruppen, haben aber hypoglykämische Wirkung. Infolgedessen kann man wohl annehmen, dass der Wirkungsmechanismus bei der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure und bei der fördernden Wirkung auf die Pankreaslipase und Nuklease ganz verschieden sein muss, und dass bei letzterer die sekundäre Alkoholgruppe im Gallensäuremoleküle für die Förderung der Wirkung unbedingt notwendig ist. Das scheint mir darauf zu beruhen, dass nach Tsuji (1930) die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure durch Lähmung der sympathischen Nervenfunktion eintritt, während die die Pankreaslipase fördernde Wirkung nach Willstätter (1923) unter Bildung von komplexem Adsorbat mit Ferment und Substrat erfolgt.

3. Versuch mit Cholansäure.

Die Stammsäure der Gallensäure, Cholansäure $C_{24}H_{40}O_2$ wurde zuerst von Wieland und Weil (1912) durch Hydrierung mit Palladiumschwarz und Wasserstoff aus Cholatriensäure und von Windaus (1919) durch Oxydation des Pseudocholestans mit Chromsäure gewonnen. Diese Säure ist in Alkalien sehr schwer löslich und bildet sehr leicht eine kolloidale Lösung. So wurde eine 1%ige Lösung unter 2 facher Verdünnung mit Wasser zum Versuch gebraucht, und zwar wurden 8–14 ccm einer solchen Lösung pro kg Körpergewicht den Kaninchen subkutan injiziert.

TABELLE II (Dehydrodesoxycholsäure).

Nr.	Körpergewicht in g:	Injizierte Dehydro- desoxycholamenge in cem pro kg Körpergewicht:	Blutzucker vor der Injektion in %:	Blutzucker nach Stunden : (%)								Prozentzahl des Blutzuckerabfalls aus dem Ausgangswerte:
				$\frac{1}{2}$	1	2	3	4	5	6	7	
1	2300	1.0	0.112	0.117	0.107	0.099	0.094	0.097	0.099	0.109	0.114	15.0
2	2080	1.0	0.099	0.104	0.094	0.091	0.086	0.081	0.089	0.094	0.098	18.1
3	2200	2.0	0.096	0.099	0.090	0.084	0.082	0.079	0.088	0.096	—	17.7
4	1920	2.0	0.107	0.104	0.102	0.091	0.084	0.089	0.097	0.102	0.110	21.5
5	2410	2.5	0.114	0.110	0.107	0.092	0.083	0.091	0.099	0.107	0.112	27.2
6	1890	3.0	0.103	0.103	0.101	0.091	0.079	0.074	0.089	0.097	0.101	28.1
7	2350	3.0	0.106	0.109	0.101	0.094	0.070	0.081	0.094	0.102	—	34.0

Als Kontrolle wurde anstatt dieser Lösung eine 0.85%ige physiologische Kochsalzlösung subkutan verabreicht. Der Einfluss beider Verfahren auf den Blutzucker wurde verglichen. Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

Wie die Tabelle III zeigt, hat die Cholansäure, die weder eine sekundäre Alkoholgruppe noch eine Ketogruppe enthält, gar keine hypoglykämische Wirkung. Diese Daten zeigen, dass für die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure die sekundäre Alkoholgruppe oder die Ketogruppe in ihrem Moleküle eine grosse Rolle spielt, ja dafür unbedingt notwendig zu sein scheint.

4. Versuch mit Cholatriensäure.

Die Cholatriensäure wurde von Wieland und Weil (1912) durch Hochvakuumdestillation bei 300°C unter Wasserabspaltung aus Cholsäure erhalten. Diese Säure enthält 3 Doppelverbindungen in ihrem Molekül und wird von wässrigen Alkalien ungemein langsam aufgenommen. Unter den gleichen Bedingungen wie beim Versuch mit Cholansäure wurde der Einfluss auf den nüchternen Blutzucker geprüft. Die Resultate sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Aus der Tabelle IV ist ersichtlich, dass auch die Cholatriensäure, die dreifach ungesättigte Gallensäure, genau wie die Cholansäure keine hypoglykämische Wirkung hat. Das weist wieder darauf hin, dass für die hypoglykämische Wirkung der Gallensäure die sekundäre Alkoholgruppe oder Ketogruppe notwendig ist.

5. Versuch mit Apocholsäure.

Apocholsäure nach Boedecker (1920) ist eine einfach ungesättigte Dioxycholeinsäure, deren beide sekundären Alkoholgruppen an der ursprünglichen Stelle des Kohlenstoff-Skelettes unangegriffen stehen. Das gesamte chemische und physikalische Verhalten der Apocholsäure weist darauf hin, dass sie in allernächster Beziehung zu der Desoxycholsäure steht. Ihre Alkalisalze sind in Wasser spielend löslich. Bei diesem Versuch wurden 2.0–4.0 ccm

TABELLE III (Cholensäure).

Nr.	Körpergewicht in g.	Blutzucker vor der Injektion in % :	Blutzucker nach Stunden : (%)							Bemerkungen :	
			1	2	3	4	5	6	7		
1	2540	0.097	0.099	0.091	0.093	0.101	0.101	0.101	0.096	0.095	0.85% NaCl-Lösung 10 ccm.
2	2460	0.095	0.097	0.089	0.091	0.101	0.101	0.099	0.094	0.102	" 12 "
1	1980	0.098	0.101	0.104	0.109	0.091	0.091	0.097	0.110	0.093	0.5% Cholensäurelösung 7.9 ccm.
2	2010	0.111	0.116	0.113	0.120	0.121	0.121	0.114	0.119	0.109	" 8.0 "
3	2250	0.104	0.098	0.098	0.094	0.096	0.096	0.107	0.098	0.101	" 11.2 "
4	2050	0.107	0.115	0.114	0.113	0.102	0.102	0.114	0.117	0.106	" 10.2 "
5	1950	0.110	0.113	0.109	0.113	0.116	0.116	0.119	0.121	0.112	" 11.7 "
6	2380	0.112	0.099	0.091	0.108	0.094	0.094	0.093	0.109	0.114	" 14.0 "
7	2230	0.097	0.102	0.101	0.098	0.105	0.105	0.106	0.105	0.104	" 13.3 "

TABELLE IV (Cholatriensäure).

Nr.	Körpergewicht in g:	Blutzucker vor der Injektion in %:	Blutzucker nach Stunden: %							Injizierte 0.5% Cholatrien- säurelösung in ccm:
			1	2	3	4	5	6	7	
1	1950	0.102	0.098	0.105	0.104	0.096	0.107	0.099	0.104	7.8 ccm
2	2250	0.093	0.097	0.103	0.096	0.099	0.105	0.098	0.094	9.0 "
3	2110	0.105	0.111	0.107	0.105	0.109	0.106	0.110	0.102	10.5 "
4	1850	0.089	0.092	0.084	0.091	0.090	0.086	0.094	0.087	11.0 "
5	2050	0.097	0.102	0.099	0.096	0.104	0.101	0.094	0.096	12.3 "
6	1980	0.098	0.101	0.095	0.104	0.101	0.096	0.099	0.098	13.0 "
7	2240	0.106	0.104	0.110	0.112	0.103	0.109	0.111	0.107	14.0 "

einer 1%igen Apocholatlösung pro kg Körpergewicht den Kaninchen subkutan zugeführt und der Einfluss derselben auf den nüchternen Blutzucker untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle V angegeben.

Aus der Tabelle V ist ersichtlich, dass bei allen 7 Versuchen die Apocholsäure ohne Ausnahme einen deutlichen Abfall des Blutzuckers bewirkt, und dass der Grad der Herabsetzung 20–32% des Ausgangswertes beträgt. Die den Blutzucker herabsetzende Wirkung der Apocholsäure tritt in fast dem gleichen Grade wie bei der Desoxycholsäure auf, aber viel später (2 Stunden) als bei den anderen gesättigten Säuren. Dies scheint mir darauf zu beruhen, dass die Resorption der Apocholsäure viel langsamer vor sich geht als die der gesättigten Säuren.

Bei intravenöser Zufuhr von 0.6–1.0 ccm einer 0.5%igen Na-apocholat-Lösung pro kg Körpergewicht tritt die hypoglykämische Wirkung nach 1.5–2.5 Stunden auf, und der Grad des Blutzucker-

TABELLE V (Apocholeensäure).

Nr.	Körpergewicht in g :	Injizierte Apocho- latmenge in cem pro kg Körpergewicht :	Blutzucker vor der Injektion in % :	Blutzucker nach Stunden : (%)									Prozentzahl des Blutzuckerabfalls aus dem Ausgangswerte :
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1	1850	2.0	0.103	0.112	0.102	0.099	0.091	0.079	0.082	0.097	0.107	—	23.3
2	2110	"	0.099	0.093	0.090	0.086	0.081	0.079	0.091	0.105	—	—	20.2
3	1950	3.0	0.101	0.105	0.106	0.104	0.100	0.093	0.075	0.085	0.097	0.105	25.8
4	2050	"	0.092	0.102	—	0.092	0.088	0.083	0.066	0.076	0.089	0.097	28.2
5	2300	3.5	0.113	0.110	0.108	0.096	0.085	0.080	0.082	0.106	0.109	0.110	29.2
6	2610	4.0	0.106	0.097	0.091	0.089	0.081	0.079	0.091	0.097	0.102	—	25.4
7	2010	"	0.098	0.093	0.090	0.086	0.079	0.066	0.087	0.091	0.097	—	32.6

abfalls ist stärker als bei subkutaner Zufuhr, wie die Tabelle VI zeigt.

TABELLE VI.

Nr.	Körpergewicht in g:	Injizierte 0.5% Apo- cholsäuremenge in cem pro kg Körpergewicht:	Blutzucker vor der Injektion in %:	Blutzucker nach Minuten: (%)							Prozentzahl des Blutzuckerabfalls aus dem Ausgangswerte:
				30	60	90	120	150	180	210	
1	2150	0.6	0.099	0.106	—	0.070	0.081	0.084	0.091	—	29.4
2	2200	0.8	0.103	0.105	0.091	0.081	0.078	0.087	0.097	—	24.2
3	2000	1.0	0.111	0.100	0.093	0.081	0.065	0.089	0.099	0.106	41.0

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Apocholsäure, Dehydrocholsäure und Dehydrodesoxycholsäure haben dieselbe hypoglykämische Wirkung wie Cholsäure und Desoxycholsäure.

2. Cholsäure und Cholatriensäure haben keine hypoglykämische Wirkung.

Auf Grund dieser Daten kann man den Schluss ziehen, dass die sekundäre Alkoholgruppe oder die Ketogruppe im Gallensäuremolekül für die hypoglykämische Wirkung eine grosse Rolle spielt, ja dafür unbedingt notwendig ist.

Zum Schlusse möchte ich den Herren Kaziro, Oda und Okamura, die mir freundlicherweise das Untersuchungsmaterial geliefert haben, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

LITERATUR.

- Adlersberg, D. und Röth, E. (1927): Arch. f. exp. Path. und Pharm., 121, 131.
 Boedecker, F. (1920): Ber. d. deut. Chem. Gesellschaft. 53, 1852.

- Fürth, O. und Schütz, E. (1907): Hofmeisters Beiträge., **9**, 28.
Kaziro, K. und Tsuji, K. (1930): J. of Biochem., **11**, 333.
Misaki, K. (1927): J. of Biochem., **8**, 235.
Murakami, K. (1928): J. of Biochem., **9**, 261.
Okamura, Takeji., (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **2**, 245.
Okamura, Teiji. (1928): J. of Biochem., **9**, 271 u. 445.
Shoda, M. (1929): J. of Biochem., **6**, 395.
Tsuji, K. (1930): J. of Biochem., **12**, 139.
Windaus, A. und Neukirchen, K. (1919): Ber. d. deut. chem. Gesellschaft., **52**, 1915.
Wieland, H. und Weil, F. J. (1912): Z. physiol. Chem., **80**, 287.
Willstätter, R. (1923): Z. physiol. Chem., **125**, 93.

A MICROMETHOD FOR THE DETERMINATION OF BLOOD PEROXIDASE.

By

H. MASAMUNE AND K. KODAMA.

(From the Medico-chemical Institute, Kyushu Imperial University, Fukuoka.)

(Received for publication, August 1, 1931)

One of the most popular methods for the determination of peroxidase is that of Willsätter and Stoll (1918) which is based on the oxidation pyrogalllic acid into purpurogallin. The method, however, requires a large amount of reagents. It is therefore, desirable to modify the method to be carried out on a much smaller scale.

The following modification has been used in this laboratory the last few years and found fairly accurate. One can determine by this method so small amount of peroxidase in 0,01–0,007 cc. of blood without serious error.

SOLUTIONS REQUIRED.

1. Pyrogalllic acid: 1 gm. of Merck's pyrogalllic acid ("crystallized" or "heavy needle crystals") is roughly weighed and dissolved in 100 cc. of water. The solution must be freshly prepared just before use and kept in ice water and in the dark.

2. Acetate buffer mixture: 0,2 normal and pH 4.

3. Hydrogen peroxide: Dilute one part of Merck's perhydrol containing 30% H_2O_2 by weight with five parts of water.

4. 20 per cent. sulfuric acid.

5. Ether.

6. Standard solution for colorimetry: 0,075 gm of potassium bichromate is dissolved in 100 cc. of 0,5 normal hydrochloric acid. Its intensity of colour corresponds to that of 0,01 per cent purpurogallin solution in ether.

PROCEDURE.

The whole analysis is to be done in ice water. Measure 30 cc. of the pyrogallie acid solution into a stoppered conic flask of 100 cc. capacity placed in ice water. Add. 2 cc. of acetate buffer mixture and 1 cc. of the hydrogen peroxide by means of pipette. Add hereafter 1 cc. of blood solution, which has been made by diluting blood 100-150 times with water. Let the mixture stand fifteen minutes, and add 5 cc. of the sulfuric acid. After a lapse of further five minutes, extract the purpurogallin produced with 20 cc. of ether, and the colour of this extract is compared with the standard which is usually set at 15 mm.

CALCULATION.

If the blood is diluted one hundred times,

$$\frac{\text{Reading of standard}}{\text{Reading of unknown}} \times 20 = \text{amount of purpurogallin in gm.}$$

produced by 100 cc. blood, and in the case when the dilution is one hundred and fifty times the ratio is to be multiplied by 30.

REMARKS.

1. The amount of the purpurogallin produced depends to a certain extent upon the concentration of the pyrogallie acid as will be shown in table I.

TABLE I.

The amount of purpurogallin produced when various quantities of pyrogallie acid solution are used. (Blood was collected from an ear vein of a male rabbit, dilution 150 times.)

Quantities of 1 % pyrogallie acid solution in cc.	5	10	20	30
Water added in cc.	25	20	10	0
Reading in mm (Standard is set at 10 mm)	20,3	16,3	12,5	11,0
The amount of purpurogallin produced by 100 cc. blood.	14,7	18,4	24,0	27,3

It is necessary therefore, that the quantity of the pyrogallie acid should be all the same through one series of experiments.

2. Acetate-buffer mixtur accelerates the reaction so much, as table II shows.

TABLE II.

The effect of reaction time and of the presence of acetate buffer upon the amount of purpurogallin produced. (Blood collected from an ear vein of a male rabbit, dilution 100 times, standard set at 15 mm.)

Time (in minute)	2	4	7	10	15	
With acetate buffer mixture {	Reading	14,5	13.0	12,9	12,8	12,5
	Amount produced by 100 cc. blood	20,7	23,1	23,3	23,4	24,0
Without acetate buffer mixture {	Reading	40,8	32,6	23,4	18,6	15,3
	Amount produced by 100 cc. blood	7,4	9,2	12,8	16,1	19,6

3. The quantity of hydrogen peroxide has no appreciable effect upon the result, except in the case where too small an amount as 0,1 cc. is used.

TABLE III.

The amount of purpurogallin formed when the quantity of hydrogen proxiide is varied. (Blood collected from an ear vein of a male rabbit, dilution 100 times.)

Quantity of hydrogen peroxide (10 %) in c.c.	0,0	0,05	0,125	0,25	0,5	1
Water added	1	0,95	0,875	0,75	0,5	0
Readings (standard set at 15 mms)	0	20,2	12,6	12,5	12,5	12,3
Amount produced by 100 c.c. blood	0	14,9	23,8	24,0	24,0	24,4

4. Sulfuric acid at the concentration used in this experiment decolorizes most of the oxidation products, but does not color purpurogallin. We tested the influence of sulfuric acid upon the

colour intensity of purpurogallin which had been previously dissolved in the smallest possible amount of acetone and then diluted in water. As a result of these experiments we found that sulfuric acid has no effect upon the purpurogallin.

5. The oxidation process comes to cease within seven minutes under the conditions of the experiment and after this time there seems to exist no increase of purpurogallin. (shown in table II). But in carrying out the determination an interval of fifteen minutes is adopted to assure the completeness of the reaction.

6. Pyrogalllic acid, dissolved in water, is readily oxidised into purpurogallin and alikes on exposure to daylight at room temperature. In the presence of hydrogen peroxide the rate of the oxidation is greatly hastened, but at a temperature under 5°C the oxidation is almost neglected in a short interval as 15 minutes. Sulfuric acid of the concentration above mentioned stops the oxidation completely.

7. The accuracy of the method can be well recognized in table IV, where the peroxidase activity of various amounts of blood are compared.

TABLE IV.

The amount of purpurogallin produced at various dilutions of blood.
(Standard set at 15 mm)

No, 1 (blood of a male rabbit)	Dilution	$\frac{1}{75}$	$\frac{1}{150}$	$\frac{1}{300}$
	Amount produced by 100 c.c. blood Reading	27,1 (8,3)	27,3 (16,5)	27,4 (32,9)
No, 2 (blood of a cock)	Dilution	$\frac{1}{75}$	$\frac{1}{150}$	$\frac{1}{300}$
	Amount produced by 100 c.c. blood Reading	23,4 (9,6)	23,9 (18,8)	23,9 (37,7)

No, 3 (blood of a hen)	Dilution	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{200}$
	Amount produced by 100 c.c. blood Reading	14,3 (10,5)	14,9 (20,2)	14 9 (40,2)

SUMMARY.

A micromethod for the determination of blood peroxidase based on the principle of the methods by Willstätter and Stoll has been described.

REFERENCE.

Willstätter, B. and Stoll, A. Liebig's Ann. Ch., 416 (1918) 21.

ÜBER PHOSPHOSALICYLALDEHYD UND OXYDATIVE DEPHOSPHORIERUNG.

VON

CHOICHIRO MANAKA.

*(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie
zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)*

(Eingegangen am 15. August 1931)

Während der Verfasser im hiesigen Institut die Studien über die Beziehung des Wirkungsbereichs der Phosphoesterase zu der chemischen Konstitution der Substrate fortsetzte, wurde von ihm (1931) beobachtet, dass die Einführung einer Carboxylgruppe an die m- oder p-Stellung der Phenylphosphorsäure keine Veränderung in dem Verhalten zu dem Ferment verursacht. Die beiden Ester, nämlich m- und p-Carboxyphenylphosphorsäure, waren bei verschiedener Wasserstoffzahl recht stabil. Dagegen verhielt sich ihr Isomer, die o-Carboxyphenylphosphorsäure ganz anders.

Dieser Phosphorsäureester der Salicylsäure konnte nämlich nicht zu dem Fermentversuch gebraucht werden, weil er in wässriger Lösung spontan sich aufspaltet. Es wurde indessen von dem Verfasser gefunden, dass die Labilität bei Ph 5.6 maximal war, und dass die Geschwindigkeit der spontanen Hydrolyse durch Zu- oder Abnahme der Acidität so ermässigt wurde, dass eine desto geringere Dephosphorierung konstatiert wurde, je weiter die Wasserstoffzahl von jenem Ph abwich.

Diese sonderbare Abhängigkeit der Labilität der Phosphosalicylsäure von der Acidität des Mediums gewann unser erhöhtes Interesse, weil bald festgestellt wurde, dass der die Labilität bedingende Faktor in der Tat nichts anderes als der Dissoziationszustand der Phosphosalicylsäure selbst war. Bei Ph 5.6, wo die Verbindung sich am schnellsten spontan hydrolysiert, ist sie an der Carboxylgruppe des Salicylsäurerests total dissoziiert vor-

handen, aber bei dem Phosphorsäureanteil ist die Dissoziation ausschliesslich auf die erste Stufe beschränkt; der zweite Wasserstoff der veresterten Phosphorsäure bleibt undissoziiert. In solchem elektrochemischen Zustand ist die o-Carboxyphenylphosphorsäure am unbeständigsten. Die Abnahme der Acidität verursacht die weitere Dissoziation des Phosphorsäurerests; die Zunahme der Acidität dagegen hemmt die des Salicylsäurecarboxyls. Die labile Dissoziationsform wird damit vermindert, und die Hydrolysgeschwindigkeit verlangsamt.

Unter Leitung von Prof. Akamatsu wurden die Experimente dann fortgesetzt. Die nächste Frage war, wie der Phosphosalicylaldehyd überhaupt sich verhalten würde.

Über den Phosphorsäureester des Salicylaldehyds wurden bisher keine Angaben gemacht. Ich konnte diese Verbindung über o-Dichlormethylphenylphosphorsäuredichlorid als Bariumsalz herstellen.

Dieser Ester war im Gegensatz zu Salicylsäureester ganz stabil.

Die Bindung zwischen Phenylgruppe und Phosphorsäure wird also durch Einführung von COOH und ausschliesslich in o-Stellung gelockert, aber nicht durch die von CHO in dieselbe Stellung.

Fermentativ wird der Phosphosalicylaldehyd in gleicher Weise wie Phenylphosphorsäure aufgespalten; durch Nierenphosphoesterase optimal bei Ph 10 und durch Takaferment bei Ph 3.

Im Anschluss an die Fermentversuche hat der Verfasser dann ein neues Experiment unternommen. Der Gedankengang war wie folgt:

Wenn die Phosphosalicylsäure überhaupt in wässriger Lösung, im Gegensatz zu Phosphosalicylaldehyd, unbeständig ist und ihre Labilität in auffallender Weise von der Wasserstoffzahl des Mediums beeinflusst wird, so würde die Oxydation des Phosphosalicylaldehyds, ihn zu Phosphosalicylsäure überführend, eine spontane Dephosphorierung verursachen. Ich habe daher Wasserstoffperoxyd bei verschiedenem Ph auf Phosphosalicylaldehyd bei 37° 3 Stunden einwirken lassen, die abgespaltete anorganische

Phosphorsäure mit Magnesiamixtur gefällt und an dem gewaschenen Niederschlag den anorganischen Phosphor mit Molybdänsäure-Hydrochinon bestimmt. Maximale Dephosphorierung wurde bei Ph 7 beobachtet.

Die nicht enzymatische oxydative Dephosphorierung wird auch bei Hydrochinonphosphorsäure erwartet. Wenn die freie OH-Gruppe des Hydrochinonrests überhaupt oxydativ angegriffen würde, müsste die veresterte Phosphorsäure dabei sofort abgespalten werden.

Das Experiment ergab, dass die Dephosphorierung mittels Wasserstoffperoxyds durch zunehmenden Ph begünstigt wurde und bei Ph 10 maximal war. Abklingen der oxydativen Dephosphorierung bei Überschreiten des Ph 10 dürfte wahrscheinlich der zugenommenen Zersetzung des Wasserstoffperoxyds selbst zugeschrieben werden müssen.

Unter derselben Bedingung wurde, wie erwähnt, die maximale Dephosphorierung des Phosphosalicylaldehyds bei Ph 7 beobachtet.

Der chemische Vorgang bei der oxydativen Hydrolyse von Phosphosalicylaldehyd besteht aus der Oxydation der CHO zu COOH und der spontanen Aufspaltung der entstandenen Phosphosalicylsäure.

Der erste Prozess, die Oxydation mittels Wasserstoffperoxyds, wird in analoger Weise wie bei Hydrochinonphosphorsäure durch zunehmende Alkalizität beschleunigt. Der zweite Prozess, die spontane Hydrolyse des Oxydationsprodukts, nämlich der Phosphosalicylsäure, erreicht, wie früher erwähnt, ihre maximale Geschwindigkeit bei Ph 5.6.

Durch Kombination von beiden Prozessen wurde darum die optimale Acidität der nicht enzymatischen oxydativen Dephosphorierung des Phosphosalicylaldehyds als Ph 7 nachgewiesen.

Die enzymatische Dephosphorierung wird gleichfalls im hiesigen Institut untersucht werden.

Experimenteller Teil.

I. DARSTELLUNG DER SALICYLALDEHYDPHOSPHORSÄURE.

1 Mol Salicylaldehyd wird portionsweise mit 1.5 Mol PCl_5 versetzt. Unter Wärme- und HCl -Entwicklung geht PCl_5 in Lösung.

Nach halbstündigem Stehenlassen wird die Reaktionsmasse noch 30 Minuten auf dem Wasserbad erhitzt und vom unreaktierten PCl_5 mittels Glaswolle abfiltriert. Das rötlich gefärbte Filtrat wird sofort unter vermindertem Druck fraktioniert.

Bei 140° – 145° 7 mm geht die Hauptmenge als farblose dicke Flüssigkeit über. Bei Rektifikation dieser Fraktion siedet sie konstant bei 142° 7 mm.

Die Substanz ist o-Dichlormethylphenylphosphorsäuredichlorid.

Analyse: 3.477 mg Substanz gaben 0.357 mg P 17.385 mg

Substanz gaben 8.404 mg Cl.

$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{PCl}_4$ (293.9) berechnet: P 10.6%, Cl 47.9%

gefunden: P 10.3%, Cl 48.3%

Das Dichlorid wird mit Benzol überschichtet und unter Kühlung in Eiswasser mit 3 Mol Wasser versetzt. Nach 2 Stunden mischt sich der Kolbeninhalt homogen unter HCl -Entwicklung.

Gegen Feuchtigkeit wird durch einen mit Calciumrohr versehenen Korkstopfen geschützt. Nach einigen Tagen wird die Reaktionsmasse in Wasser gelöst und mit Baryt neutralisiert. Der Überschuss von Baryt wird durch CO_2 entfernt. Beim Einengen des Filtrats kommt das Bariumsalz des Phosphosalicylaldehyds in reichlicher Menge zur Ausscheidung. Die Substanz wird in Wasser gelöst und durch Zusatz des gleichen Volumen Alkohol gefällt. Der Niederschlag besteht aus schön ausgebildeten nadligen Kristallen und ist schon analysenrein. Kristallwasserfrei.

Analyse:

$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_5\text{PBa}$ (337.42) berechnet: P 9.2%, Ba 40.7%

gefunden: P 9.0%, Ba 40.3%

Bei den Hydrolysenversuchen wurde das Bariumsalz durch Doppelumsetzung mit Kaliumsulfat in Kalisalzlösung übergeführt.

Über die Hydrochinonphosphorsäure siehe die vorige Mitteilung des Verfassers.

II. FERMENTLÖSUNGEN.

Sie waren dieselben wie in der vorigen Mitteilung angegeben.

III. FERMENTVERSUCHE.

Sie waren dieselben wie in der vorigen Mitteilung angegeben.

A. Nierenferment.

Versuchslösung bestand aus:

M/200 Substratlösung	5.0 ccm
Puffer	5.0 ccm
Wasser	10.0 ccm
Fermentlösung	5.0 ccm

Salicylaldehydphosphorsäure (M/1000) + Nierenferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
7.9	Spur	0.0056	0.0106
8.5	0.0032	0.0059	0.0135
9.2	0.0082	0.0158	0.0280
10.0	0.0133	0.0222	0.0310
11.2	0.0121	0.0190	0.0244
12.5	Spur	Spur	Spur

B. Takaferment.

Die Versuchslösung war wie bei Nierenferment.

Salicylaldehydphosphorsäure (M/1000) + Takaferment.

Ph \ Zeit	$\frac{1}{2}$ St.	1 St.	$2\frac{1}{2}$ St.
3.1	0.0222	0.0310	0.0310
5.6	0.0156	0.0232	0.0274
6.5	Spur	Spur	0.0053

Pufferlösungen waren wie bei der vorigen Mitteilung.

Versuchstemperatur 37°.

Bestimmung des abgespalteten anorganischen Phosphors wurde wie früher kolorimetrisch nach Briggs ausgeführt. Die in obigen Protokollen angegebene mg-Zahl bedeutet den nachgewiesenen anorganischen Phosphor, für 1 ccm der Versuchslösung berechnet.

Bei 100%iger Hydrolyse sollen also 0.0310 mg P abgespalten werden.

IV. OXYDATIVE DEPHOSPHORIERUNG.

Versuchslösung bestand aus:

M/100 Kalisalz der Phosphorsäureester	5.0 ccm
Puffer	10.0 ccm
Oxyfull (Sankyo)	5.0 ccm

Die Lösung wurde in ein Wasserbad von 37° gestellt und nach 3 Stunden 5 ccm davon mit dem gleichen Volumen ammoniakalischer Magnesiamixtur versetzt. Nach 30 Minuten wurde der Niederschlag zentrifugiert, erst mit 14%igem Ammoniak, dann mit alkoholischem 0.3%igem Ammoniak gewaschen und getrocknet. Er wurde dann mit 5 ccm 4%iger Trichloressigsäure quantitativ in einen Messzylinder von 10 ccm eingewaschen und nach Briggs mit Molybdänsäure-Hydrochinon versetzt. Kontrollversuche wurden bei jedem Ph angestellt. Dabei wurden 5 ccm Lösung des Esters mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt. Der Kontrollenwert wurde jedesmal vom Wert des Hauptversuchs

abgezogen. In den folgenden Protokollen wurde der oxydativ abgespaltene anorganische Phosphor in mg, für 5 ccm der Versuchslösung berechnet, angegeben. 100%ige Hydrolyse soll 0.3878 mg P liefern.

A. Salicylaldehydphosphorsäure (M/400) + H₂O₂

Ph	anorg. Phosphor	
	in mg	in %
3.1	0.0392	10.1
5.6	0.0648	16.7
6.5	0.0673	17.4
7.0	0.0728	18.8
8.0	0.0518	13.4
9.3	0.0421	10.9
10.1	0.0208	5.4
11.3	0.0144	3.7
12.4	0.0204	5.3

B. Hydrochinonphosphorsäure (M/400) + H₂O₂

Ph	anorg. Phosphor	
	in mg	in %
3.1	0.0175	4.5
5.6	0.0258	6.7
6.5	0.0598	15.4
7.0	0.0979	25.2
8.5	0.1108	28.6
9.3	0.2205	56.8
10.1	0.2477	63.9
11.3	0.2205	56.8
12.4	0.1476	38.1
12.9	0.1227	31.6

LITERATUR.

Manaka, C. (1931): J. Biochem. 14, 191.

STUDIEN ÜBER GALLENSÄURENSTOFFWECHSEL.

(Begonnen und geleitet von S. Nakagawa.)

IV. Über den Einfluss der Bakterien und der Ultraviolett- und Röntgenstrahlen auf Gallensäuren.

VON

HISASHI MIKAMI.

(Aus der medizin. Klinik der Kaiserlichen Universität zu Sapporo.

Vorstand: Prof. Dr. S. Nakagawa.)

(Eingegangen am 15. August 1931.)

I. EINLEITUNG.

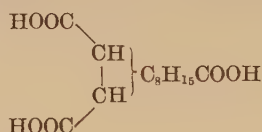
Es ist schon lange wohl bekannt, dass die Gallensäuren in tierischen Körpern einen sogenannten enterohepatischen Kreislauf ausführen, indem Gallensäuren, die in den Darm ausgeschieden sind, ins Blut zurückresorbiert werden, um wieder aus der Leber in die Galle sezerniert zu werden (Stadelmann 1896; v. Bergmann 1904; Foster, Hooper und Whipple 1919); nur ein kleiner Teil der Gallensäuren wird mit den Faezes nach ausserhalb des Körpers transportiert. Deswegen kommen die Gallensäuren schon in physiologischer Weise im Darne mit den Darmbakterien in sehr innige Berührung. Dies ist bei pathologischen Zuständen besonders der Fall, weil verschiedene Arten von Bakterien dabei auch schon in den Gallenblasen und -gängen nachgewiesen worden sind. Ob und wie die Bakterien dabei irgendeinen Einfluss auf die Gallensäuren ausüben, ist jedoch noch nicht vollkommen sichergestellt.

Nun werden die Gallensäuren in der Galle mit verschiedenen Methoden bestimmt; Sakamoto und Fujikawa (1931) haben in unserem Laboratorium mittels der hier von Nakagawa und Fujikawa angegebenen kolorimetrischen Mikrobestimmung Gallensäuren in menschlicher und Hunde-Galle quantitativ ermittelt und

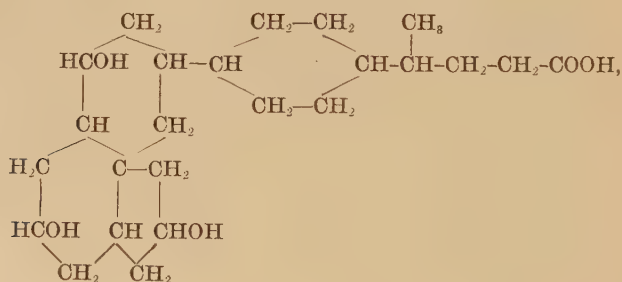
die Werte mit den mit der Foster- und Hooperschen gasometrischen Methode erhaltenen verglichen, mit dem Ergebnis, dass sowohl bei den normalen, als auch bei den pathologischen Gallen, welche Leber- und Gallenwegkranken entnommen sind, keine bedeutenden Unterschiede zu bemerken sind. Um dies noch genauer zu bestätigen, haben wir diesmal mit reinen Gallensäurenlösungen gearbeitet und zwar in der Absicht, zu sehen, ob die Nakagawa-Fujikawasche Methode auch bei pathologischen Gallen brauchbar ist oder nicht.

II. SPALTUNG DER GALLENSÄUREN DURCH BAKTERIENWIRKUNG.

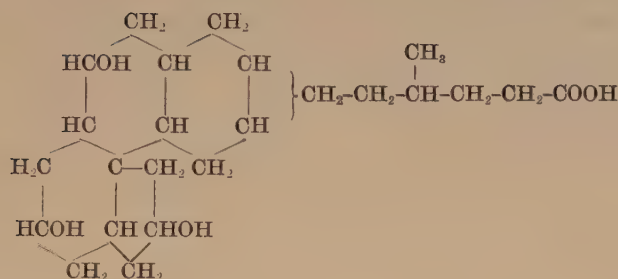
Die Struktur der Gallensäuren war lange Zeit dunkel geblieben, bis neuerdings Wieland und Schlichting (1924) ihre mühevollen Untersuchungen veröffentlichten; die Autoren haben nämlich durch stufenweise Spaltung der Desoxybiliansäure eine Tricarbonsäure $C_{13}H_{20}O_6$ erhalten, in der alle drei bekannten Ringe zerstört sein müssen, und haben strukturell folgende Formel angegeben:



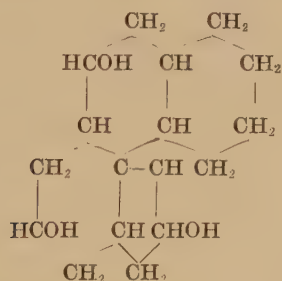
Durch weitere Untersuchungen sind Wieland und Schlichting (1924) zu dem Ergebnisse gekommen, dass die Gallensäuren vier Ringe in sich besitzen, und haben die nachstehenden Formeln zur Annahme empfohlen:



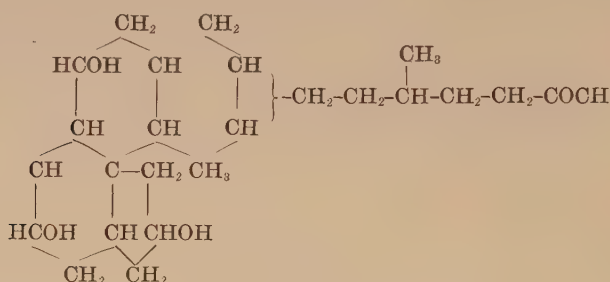
oder



Andererseits haben Panzer (1909), Wieland und Schlichting (1922) durch energische Oxydation der Cholsäure mit Salpetersäure, α -Methylglutarsäure und Bernsteinsäure isoliert; aus diesen Tatsachen ist anzunehmen, dass die ursprüngliche Carboxylgruppe der Gallensäuren das Ende einer verzweigten Kette $\begin{array}{c} -\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ | \\ \text{CH}_3 \end{array}$ bildet. Neuerdings hat Kaziro (1925) die Cholsäure durch Bakterium soli commune zu spalten versucht, in der Hoffnung, dass er durch chemische Analyse solcher Spaltungsprodukte der Gallensäuren eine noch klarere Einsicht in die Struktur derselben erhalten könnte. Es ist ihm schliesslich gelungen, daraus eine neue Substanz rein zu isolieren, welche prächtig schuppenartig kristallisiert; sie wird von wässrigen Alkalien nicht aufgenommen, sodass die Säurenatur der Gallensäuren sicher verloren ging. Durch chemische Analyse konnte er feststellen, dass das Molekulargewicht 280 und die Formel $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_3$ sei. Auf Grund dieser Tatsachen hat Kaziro



der von ihm isolierten Substanz obige Struktur gegeben:
und ist zu dem Schluss gekommen, dass die Cholsäure folgende
Formel besitzen muss:



Ausser diesen chemischen Untersuchungen sind einige Forschungen über die Bakterienwirkung auf Gallensäure vom biologischen Standpunkte aus unternommen worden. Schon Gerard (1905) vermutete, dass die Gallensäuren durch *Bacterium coli* chemisch beeinflusst werden müssten: er hat nämlich gefunden, dass das Cholesterin aus Gallensäure-Cholesterinlösung auskristallisiert, wenn man die Lösung mit *Bacterium coli* beimpft, während die steril gebliebene Kontrolle klar bleibt. 1907 hat Kramer weiter bewiesen, dass aus Galle-Bouillon Calcium phosphoricum, Magnesium phosphoricum, Calcium carbonicum, Gallenfarbstoffe und Cholesterin auskristallisierten, wenn Galle-Bouillon mit *Bacterium coli* oder *typhi* beimpft wurde; er vermutet daraus, dass die gekuppelten Gallensäuren unter dem Einfluss von Bakterien in Cholsäure und Aminosäure gespalten würden. Exner und Heyrovsky (1908) haben in ähnlicher Weise Menschen- und Rindergalle mit verschiedenen Bakterien beimpft und sind indem sie die zurückgebliebenen Gallensäuren nach 5 Tagen Bebrütung gravimetrisch bestimmten, zu dem Ergebnisse gekommen, dass die gallensäurespaltende Fähigkeit der Bakterien in folgender Reihenfolge abfällt: *Bacterium typhi*, *coli*, *proteus*, *pyocyaneus*, *pneumoniae* Friedländer, *staphylococcus pyogenes aureus*, *lactis aerogenes*, *staphylococcus pyogenes longus*. Die Frage, wo die gekup-

pelten Gallensäuren gespalten würden, haben sie bei ihren Untersuchungen nicht berührt. Bondi und Hess (1908) haben auch bewiesen, dass die Glykocholsäure durch Bakterien chemisch umgewandelt wird, sodass sie nicht mehr pettenkoferpositiv reagiert.

Aus diesen bisherigen Ergebnissen kann man ersehen, dass einige Autoren die Spaltung der gekuppelten Gallensäuren an der Kuppelungsstelle der Aminosäure annehmen, während sie nach anderen Forschern an einer anderen Stelle gespalten werden. Hierauf hat neuerdings Licht (1924), um zu sehen, wo die Gallensäuren durch Bakterien gespalten werden in der Weise gearbeitet, dass er die zurückgebliebenen Gallensäuren einerseits nach dem Foster-Hooperschen Verfahren, andererseits gravimetrisch bestimmte. Nach ihm soll die nach Foster-Hooper zu ermittelnde Gallensäure nicht deutlich vermindert sein, auch wenn man 1–3 Wochen *Bacterium coli*, *typhi*, *proteus*, *fecalis alcaligenes*, *streptococcus pyogenes longus* und *staphylococcus aureus* einwirken lässt. Dasselbe Resultat hat er bei den mit Fäzes beimpften Versuchen erhalten. Im Gegensatz dazu ist er aber zu dem Ergebnis gekommen, dass die gravimetrisch zu ermittelnden Gallensäuren unter Einfluss von *Bacterium coli*, *typhi*, *proteus*, *pyocyaneus*, *streptococcus longus*, *staphylococcus aureus* eine bedeutende Verminderung erfahren. Hieraus hat er geschlossen, dass die Glykocholsäure durch die Coli-Typhus-Gruppe nicht an der Kuppelungsstelle gespalten, sondern an einer anderen Stelle verändert wird, sodass sie nicht mehr gravimetrisch zu ermitteln ist.

Klinisch hat es keine grosse Bedeutung, wie die gekuppelten Gallensäuren durch Bakterien beeinflusst werden, aber es ist sehr bedeutungsvoll, ob man die durch Bakterien veränderten Gallensäuren mittels der Nakagawaschen Methode zu ermitteln imstande ist; man muss ja sehr häufig bei den klinischen Untersuchungen mit solchen pathologischen Gallen arbeiten. Wir haben deswegen Gallensäurelösung mit *Bacterium coli commune* beimpft und die Gallensäure einerseits mit der Nakagawaschen Methode, anderseits mit dem Foster-Hooperschen Verfahren ermittelt und die

TABELLE I.

Glykocholsaures Natrium (mg%)				
Bebrütung (Tage)	Zimmertemperatur		Eisschrank	
	Foster	Nakagawa	Foster	Nakagawa
vor	249.7	250.0	249.7	250.0
8	241.1	250.0	237.2	266.0
21	225.0	236.0	228.4	249.0
35	220.1	234.0	218.5	235.5
50	209.8	221.4	209.0	226.2

TABELLE II.

Taurocholsaures Natrium (als Glykocholsaures Na)				
Bebrütung (Tage)	Zimmertemperatur		Eisschrank	
	Foster	Nakagawa	Foster	Nakagawa
vor	596.3	588.0	596.3	588.0
8	590.0	545.0	590.0	554.0
35	517.0	446.0	526.5	458.4
50	452.0	406.4	444.4	413.2
70	401.0	312.0	431.5	396.0

Werte untereinander verglichen.

Aus Tabelle I und II kann man ersehen, dass sich die Gallensäuren langsam vermindern, und zwar mit beiden Methoden bestimmt ganz parallel.

Exner und Heyrovsky haben angegeben, dass die Gallensäuren in wässrigen Lösungen, auch wenn steril aufbewahrt, allmählich gespalten werden. Um dies nachzuprüfen, haben wir die wässrigen Gallensäurenlösungen einerseits im Kochschen Apparat sterilisiert, anderseits mit *Bacterium coli* beimpft mit folgendem Resultat:

TABELLE III.

	Tage	Steril		mit Bact. coli	
		Foster	Nakagawa	Foster	Nakagawa
Taurochol- saures Na	vor	569.9	598.0	569.9	568.0
	21	560.0	561.0	503.8	478.8
	64	524.0	501.0	452.5	429.0
Glykochol- saures Na	vor	480.0	472.0	480.0	472.0
	21	474.6	468.1	441.5	434.0
	64	440.2	426.0	381.7	366.0

Aus diesen Resultaten ersieht man, dass die Gallensäuren auch in sterilen wässrigen Lösungen allmählich abnehmen, wenn auch in geringerem Grade als die Coli-beimpften. Auch in diesem Falle sind die Werte, welche die beiden Bestimmungsmethoden zeigen, fast immer gleich.

Es lässt sich aus den erhaltenen Resultaten schliessen, dass die Gallensäuren durch *Bacterium coli* sicher gespalten werden; das kommt aber auch in sterilen wässrigen Lösungen vor, wenn auch in geringerem Grade. Die veränderten Gallensäuren entziehen sich der quantitativen Bestimmung, ob man sie mit der Nakagawaschen oder der Foster-Hooperschen Methode zu ermitteln versucht. Deswegen kann man sich aber auch bei zersetzten Gallen der Nakagawaschen Methode ruhig bedienen, wenn man sich mit den Werten des Foster-Hooperschen Verfahrens begnügt; die erstere Methode hat darin einen grossen Vorteil, dass sie in kurzer Zeit durchzuführen ist.

Nun kommt die Frage in Betracht: Wie kann Gallensäure ohne Veränderung aufbewahrt werden? Um diese Frage zu beantworten, haben wir die Galle oder Gallensäure in alkoholischer Lösung aufbewahrt und mit der in wässrigen Lösungen aufbewahrten verglichen.

TABELLE IV.

	alkoholische Lg. des glykochol- sauren Na	0,5 ccm Hundegalle 37°C		
		nicht sterilis.	sterilis.	15 ccm Alkohol zugesetzt
vor	13 mg%	952 mg%	952 mg%	952 mg%
2	13	896	912	952
4	13	856	880	952
6	13	840	856	952
8	12.8	800	856	952
10	13	800	840	952
14	13	760	760	952
20	13	712	752	936

Wie man aus Tabelle IV leicht ersieht, bleiben die Werte der in Alkohol aufbewahrten Gallensäuren auch nach geraumer Zeit konstant, während sie sonst immer allmählich abnehmen. Alkohol ist also als bestes Aufbewahrungsmittel für Gallensäure zu betrachten. Von diesem Standpunkte aus hat man in unserem Laboratorium zu der Gallen Alkohol sofort hinzugesetzt und das Gemisch aufbewahrt, bis man zur quantitativen Bestimmung bereit war. Wir betonen dies besonders; denn diese Vorsichtsmassnahme wird nicht nur bei der quantitativen Bestimmung, sondern auch bei der Darstellung der Gallensäuren notwendig sein. Es ist ja bekannt, dass die käuflichen Gallensäurenpräparate an Reinheit sehr zu wünschen übrig lassen.

III. EINFLUSS DER STRAHLEN AUF GALLENSÄUREN.

Es ist wohl bekannt, dass Cholesterin, in Lösung intensiv ultraviolett bestrahlt, Photoaktivität erhält und eine antirachitische Wirkung entfalten kann. Andererseits haben schon Schulze und Winterstein (1904) die Veränderung des Cholesterins durch Ultraviolettstrahlen nachgewiesen und Beumer (1925) auch gefunden, dass das Cholesterin dabei die Digitoninfällbarkeit einbüsst. In demselben Jahre haben Ruffo und Correa (1925) bewiesen,

dass das Cholesterin, in Chloroformlösung der Ultraviolettbestrahlung ausgesetzt, seine Liebermannsche Reaktion verliert. Anderseits haben Schreus und Schulze (1928) bestätigt, dass Cholesterin durch therapeutische Dosen der Röntgenstrahlen seine Digitoninfällbarkeit nicht einbüsst.

Dass eine innige Beziehung zwischen Cholesterin und Gallensäuren bestehen wird, daran kann man kaum zweifeln: sie gehören ja zusammen zur Sterinreihe. Deswegen haben wir untersucht, ob die Strahlen wie auf Cholesterin so auch auf Gallensäuren irgendeinen Einfluss ausüben können.

Wir haben cholsaures, glykocholsaures und taurocholsaures Natrium in Wasser aufgelöst, in eine Schale als dünne Schicht eingebracht, mit künstlicher Höhensonne bestrahlt, und die Gallensäuren vor und nach der Bestrahlung durch die Nakagawasche Methode ermittelt.

TABELLE V.

Gallensäure (als glykocholsaures Na)				
	vor Bestr.	nach Bestrahlung		
		30'	60'	90'
Cholsaures Na	97.2 mg%	84.5	78.1	61.0
Glykochols. Na	109.5	96.3	87.3	78.8
Taurochols. Na	52.8	49.4	44.9	37.6

Hiernach scheinen die Gallensäuren unter Einfluss der Ultraviolettstrahlen irgendeine Veränderung zu erfahren, sodass sie nicht mehr gegen die Nakagawasche rote Reaktion reagieren können.

Wenn man aber die menschliche, Hunde-, Bären- und Kaninchen-Galle in dünner Schicht ultraviolet bestrahlte, so konnte man im Gegensatz zu der reinen Gallensäurenlösung keine Veränderung der Nakagawaschen roten Reaktion bemerken, auch wenn man

ziemlich intensiv bestrahlte. Wenn man aber die Gallensäuren zuerst aus den erwähnten Gallen extrahierte und als wässrige Lösungen bestrahlte, so nahm die Nakagawasche Reaktion deutlich ab. Wie lässt sich diese paradoxe Erscheinung erklären? Wohl daraus, dass die in den Gallen befindlichen leicht oxydablen Substanzen wie z.B. Bilirubin bei der Bestrahlung am schnellsten umgewandelt werden, sodass die Gallensäuren als ganze nicht genug der Bestrahlung ausgesetzt werden können.

TABELLE VI.

Gallensäure (als glykocholsaures Na mg%)			
Arten	vor Bestrahlg	nach Bestrahlg	Bemerkungen
Menschl. G.	495	480	Abstand 20 cm Dauer 1,5 Std.
Hundegalle	568	568	
Hundegalle	875	870	
Kaninchengalle	151	160	
Bärengalle	149,6	156,2	
Kaninchengalle	256	209,6	Gallensäuren zuerst extrahiert und als wässrige Lösung bestrahlt
Bärengalle	148,5	111	

Was den Einfluss der Röntgenbestrahlung auf Gallensäure anbelangt, so ist es ganz anders; wir haben die wässrigen Gallensäurelösungen mit 1 HED bestrahlt und konnten gar keine Veränderung feststellen. Das bedeutet aber noch nicht, dass die Röntgenstrahlen absolut unwirksam auf Gallensäuren seien; wir müssen uns vorläufig damit begnügen, dass man mit 1 HED keinen Einfluss auf Gallensäuren bemerken konnte.

TABELLE, VII.

Gallensäure			
	vor Röntgen	nach Röntgen	Bemerkungen
Cholsaures Na	192.2	183.1	Filter 0,5 mm Zn-3 mm Al.
Glykocholsaures Na	73.8	72.6	Wellenlänge 0,067 A 185 KV
Taurochols. Na	137	135	Abstand 25 cm Dauer 40 Min.

IV. SCHLUSSFOLGERUNG.

1. Gallensäuren scheinen in wässrigen Lösungen, auch wenn im Kochschen Apparat sterilisiert und aufbewahrt, nicht absolut beständig zu sein. Die mit Nakagawascher und Foster-Hooperscher Methode ermittelten Werte fallen dabei allmählich und zwar in gleichem Grade ab. Das ist auch der Fall, wenn die Gallensäuren mit Koli beimpft werden. Deswegen kann man sich der Nakagawaschen Methode auch bei der zersetzten Galle ruhig bedienen, denn sie gibt gleiche Werte an wie die Foster-Hoopersche Methode.

2. Die Gallensäuren in der Galle, oder die schon isolierten Gallensäuren sind in alkoholischen Lösungen lange Zeit beständig; es ist deshalb dringend zu empfehlen, die Gallen sowohl bei der quantitativen Bestimmung als auch bei der Darstellung der Gallensäuren möglichst schnell mit Alkohol zu versetzen.

3. Gallensäuren erfahren durch Ultraviolettstrahlen irgendeine Veränderung, sodass sie gegen die Nakagawasche rote Reaktion nicht mehr zu reagieren imstande sind.

4. Röntgenstrahlen in einer Dosis bis 1 HED bewirken, wie die mit der Nakagawaschen Reaktion erhaltenen Resultate zeigen, keine Veränderung der Gallensäuren.

LITERATUR.

- v. Bergmann (1904): Hofmeisters Beitr., 4.
Beumer (1925): Münch. med. W. Jg. 72, Nr. 38.
Bondi und Hess (1908): Wiener klin. W. 271.
Exner und Heyrovsky (1908): Arch. f. klin. Chir., 86, 609.
Foster und Hooper (1919): 38, 355.
Foster, Hooper und Whipple (1919): 38, 379.
Gerard (1905): zit. n. Licht.
Kaziro (1925): Zs. f. physiol. Chem., 145, 227.
Kramer (1917): J. of exp. Med., 9, 3.
Licht (1924): Bioch. Zs., 153, 159.
Nakagawa und Fujikawa (1931): diese Zs., 12, 399.
Panzer (1909): Zs. f. physiol. Chem., 60, 376.
Roffo und Correa (1925): Strahlentherapie, 19, 541.
Sakamoto und Fujikawa (1931): diese Zs.,
Schulze und Winterstein: zit n. Neuberg, Der Harn, 520.
Schreus und Schulze (1928): Fortschritte a. d. Geb. der Röntgenstrahlen, 37, 212.
Stadelmann (1896): Zs. f. Biol., 34, 1.
Wieland und Schlichting (1924): Zs. f. physiol Chem., 134, 276.

INDEX TO VOLUME XIV.

A

ABE, Makoto, YOSHIMURA, Katsuji and TADOKORO, Tetsutaro. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins. 145.

Acidosis, The change in the amount of blood-chlorine during asphyxiation from the view-point of —. 419.

Allantoin, Über die quantitative Bestimmung des —s auf kolorimetrischem Wege. 391.

Allantoinase, Über die —. 405.

Allantoingehalt, Über den — des Harns von Neugeborenen und Schwangeren, und des Amnioskwassers. 413.

Amnioskwasser, Über den Allantoingehalt des Harns von Neugeborenen und Schwangeren, und des —s. 413.

Asphyxiation, The change in the amount of blood-chlorine during — from the view-point of acidosis. 419

B

Bactericidal action of phenols, The effect of peroxidase on the — — —. 95.

Bakterien, Über den Einfluss der — und der Ultraviolett- und Röntgenstrahlen auf Gallensäure. 489.

Blood-chlorine, The change in the amount of — during asphyxiation from the view-point of acidosis. 419.

Blut, Phosphorsäure im — bei Zufuhr von Cholsäure. 51.

C

Cell, On the effect of dye-stuffs on the vitality of isolated liver cells and on the activity of hydrolases within the —s. 291.

Chlorion, Über den Einfluss der —en auf die Speichel-amylase. 339.

Cholsäure, Phosphorsäure im Blut bei Zufuhr von —. 51.

Cold-blooded animals, The cold, non-complementary hemolysis by the heated serum of — —. 1.

Cold-hemotoxin, A — newly discovered in the heated serum. 1. 9.

D

Determination of peroxidase, A micromethod for the — — —. 475.

Diphenyl-pyrophosphorsäure, Über die fermentative Spaltung der — — —. 25.

Dye-stuffs, On the effect of — on the vitality of isolated liver cells and on the activity of hydrolases within the cells. 291.

E

- Eiweisstoffwechsel, Der Einfluss der Temperatur auf den ——. 111.
 Enzyme, On the durability of the vitality of isolated liver cells and their —s. 279.
 Extrativstoffe, Die stickstoffhaltigen — der Krötenleber während der Sommerzeit. 111.

F

- Fermentative Spaltung, Über die — — der Diphenyl-pyrophosphorsäure. 25.

G

- Gallensäure, Bedeutung der — im Kohlehydratstoffwechsel. 123.
 Gallensäure, Beiträge zur Kenntnis der hypoglykämischen Wirkung der —. 463.
 Gallensäure, Über den Einfluss der Bakterien und der Ultraviolett- und Röntgenstrahlen auf —n. 489.
 Gallensäure, Über den Einfluss der — auf den Phosphorstoffwechsel. 51.
 Gallensäure, Über den Einfluss der — auf Glycerophosphatase. I. II. 61. 439.
 Gallensäurenstoffwechsel, Studien über —. 489.
 Glutathione content of organ tissues of guinea pigs fed on vitamin C free diet. 325.
 Glycerophosphatase, Über den Einfluss der Gallensäure auf —. 61, 439.

- Guinea pig, Glutathione content of organ tissues of — —s fed on vitamin C free diet. 325.

H

- Harn, Über den Allantoingehalt des —s von Neugeborenen und Schwangeren, und des Amnioskwassers. 413.
 Heated body-fluids, The cold, non-complementary hemolysis by the — —. 9.
 Heated serum, A cold-hemotoxin, newly discovered in the — —. 1, 9.
 Hemoglobin, On the physico-chemical differences between α -, β - and γ —s. 145.
 Hexosephosphorsäure, Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der — in der Leber, der Niere und im Muskel. 123.
 HORIGUCHI, Shusuke. Studies on the excretion of neutral sulphur and oxyproteic acid in urine under several different conditions. 265.
 HORIGUCHI, Shusuke. The determination of oxyproteic acid in urine. 257.
 HORIUCHI, Kiyoshi. Über die phytase und die Spezifität der Phosphoesterase. 163.
 Hydrocyanic acid, Biochemical studies on —. 447.
 Hydrolases, On the effect of dye-stuffs on the vitality of isolated liver cells and on the activity of — within the cells. 291.
 Hydrolyse, Über die fermentative —

der verschiedenen Phosphorsäure-
ester und die spontane Hydrolyse
der Phosphosalicylsäure. 191.

Hyperglycemia, On the cause of hydro-
cyanic acid —. 447.

Hypoglykämische Wirkung, Beiträge
zur Kenntnis der —n — der
Gallensäure. 463.

I

INOUE, Takeo. Über das Wesen der
Pilocarpinhyperglykämie. 215.

K

KIMURA, Tadao. Über den Einfluss
der Gallensäure auf den Phos-
phorstoffwechsel. I. Phosphor-
säure im Blut bei Zufuhr von
Cholsäure. 51.

KODAJIMA, Shyokichi. Some studies
on isolated liver cells.

I. On the durability of the vitality
of isolated liver cells and their
enzymes. 279.

II. On the effect of dye-stuffs on the
vitality of isolated liver cells and
on the activity of hydrolases
within the cells. 291.

KODAMA, K. and MASAMUNE, H. A
micromethod for the determina-
tion of peroxidase. 475.

Kohlehydratstoffwechsel, Bedeutung
der Gallensäure im —. 123.

KOJIMA, Shunsuke. Studies on peroxi-
dase.

I. Potentiometric studies on peroxi-
dase. 79.

II. The effect of peroxidase on the
bactericidal action of phenol. 95.

Krötenleber, Die stickstoffhaltigen
Extrativstoffe der — während
der Sommerzeit. 111.

KUDO, Fumio. Biochemical studies on
hydrocyanic acid. VII. On the
cause of hydrocyanic acid hyper-
glycemia. 447.

KURATA, Kuraji. Über der fermenta-
tive Spaltung der Diphenyl-
pyrophosphorsäure. 25.

L

Leber, Über den Einfluss der Gallen-
säure auf die Synthese und Spalt-
ung der Hexosephosphorsäure in
der —, der Niere und im
Muskel. 123.

Liver cells, Some studies on isolated
——. 279, 291.

M

MANAKA, Choichiro. Über die fer-
mentative Hydrolyse der verschie-
denen Phosphorsäureester und die
spontane Hydrolyse der Phospho-
salicylsäure. 191.

MANAKA, Choichiro. Über Phospho-
salicylaldehyd und oxidative De-
phosphorierung. 481.

MASAMUNE, H. and KODAMA, K. A
micromethod for the determina-
tion of peroxidase. 475.

Micro method, A colorimetric —
—— for the determination of
pentoses. 343.

Micro method, A — — for the
determination of peroxidase. 475.

MIKAMI, Hisashi. Studien über Gallen-
säurenstoffwechsel. IV. Über den
Einfluss der Bakterien und der

Ultraviolett und Röntgenstrahlen auf Gallensäuren. 489.

Muskel, Ein Beitrag zum Studium der Eigenschaften des Plasmaeiweisses von quergestreiften —. 305.

Muskel, Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der Hexosephosphorsäure in der Leber, der Niere und im —. 123.

N

Neugeborenen, Über den Allantoingehalt des Harns von —en und Schwangeren, und des Amnioskalters. 413.

Neutral sulphur, Studies on the excretion of — — and oxyproteic acid in urine under several conditions. 265.

Niere, Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der Hexosephosphorsäure in der Leber, der — und im Muskel. 123.

O

OKAYAMA, Daisaburo. The redox-potential of the living tissue. 69.

OMORI, T. Über den Einfluss der Chlorionen auf die Speichela-mylase. 339.

OMORI, T. Über Schwermetallkatalyse von biologischem Interesse. I. Mitteilung. Der Stärkeabbau durch künstliche Peroxidase. 331.

Organ tissues, Glutathione content of — — of guinea pigs fed on vitamin C free diet. 325.

Oxyproteic acid, Studies on the excretion of neutral sulphur and — — in urine under several different conditions. 265.

Oxyproteic acid, The determination of — — in urine. 257.

P

Pentose, A colorimetric micro method for the determination of —s. 343.

Peroxidase, A micromethod for the determination of —. 475.

Peroxidase, Studies on —. 79, 95.

Peroxydase, Der Stärkeabbau durch künstliche —. 331.

Phenol, The effect of peroxidase on the bactericidal action of —. 95.

Phosphoesterase, Über die Phytase und die Spezifität der —. 163.

Phosphorsäure im Blut bei Zufuhr von Cholsäure. 51.

Phosphorsäureester, Über die fermentative Hydrolyse der verschiedenen — und die spontane Hydrolyse der Phosphosalicylsäure. 191.

Phosphorstoffwechsel, Über den Einfluss der Gallensäure auf der —. 51.

Phosphosalicylsäure, Über die fermentative Hydrolyse der verschiedenen Phosphorsäureester und die spontane Hydrolyse der —. 191.

Physico-chemical differences, On the — — between α -, β , and γ -hemoglobins. 145.

Phytase, Über die — und die Spezifität der Phosphoesterase. 163.

Pilocarpinhyperglykämie, Über das Wesen der ——. 215.

Plasmaeiweiss, Ein Beitrag zum Studium der Eigenschaften des —es vom quergestreiften Muskel. 305.

Potentiometric studies on peroxidase. 79.

Q

Quergestreiften Muskel, Ein Beitrag zum Studium der Eigenschaften des Plasmaeiweisses vom ——. 305.

R

Redox-potential, The — of the living tissue. 69.

Ro, Kishun. Über den Allantoingehalt des Harns von Neugeborenen und Schwangeren, und das Amnioskalters. 413.

Ro, Kishun. Über die Allantoinase. 405.

Ro, Kishun. Über die quantitative Bestimmung des Allantoin auf kolorimetrischem Wege. 391.

Ro, Kishun. Über die Urikase. 361.

Röntgenstrahlen, Über den Einfluss der Bakterien und der Ultraviolet- und — auf Gallensäuren. 489.

S

SASO, Takeshi. The change in the amount of blood-chlorine during asphyxiation from the view-point of acidosis. 419.

SATO, Ryoji and OHATA, Shinsuke.

Studies in experimental scurvy. XI. Glutathione content of organ tissues of guinea pigs fed on vitamin C free diet. 325.

Schwanger, Über den Allantoingehalt des Harns von Neugeborenen und —en, und des Amnioskalters. 413.

Schwermetallkatalyse, Über — von biologischem Interesse. 331.

Scurvy, Studies in experimental —. 325.

SIBUYA, Sigetosi. Der Einfluss der Temperatur auf den Eiweissstoffwechsel. I. Die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Krötenleber während der Sommerzeit. 111.

Speichel-amylase, Über den Einfluss der Chlorionen auf die ——. 339.

Spezifität, Über die Phytase und die — der Phosphoesterase. 163.

Stärkeabbau, Der — durch künstliche Peroxydase. 331.

SUMINOKURA, Kunihiro. A colorimetric micro method for the determination of pentoses. 343.

T

TADOKORO, Tetsutaro, ABE, Makoto and YOSHIMURA, Katsuji. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins. 145.

TAKATA, Hiroshi. Über den Einfluss der Gallensäure auf Glycerophosphatase. I. II. 61. 439.

TANAKA, Keizo. Beiträge zur Kenntnis der hypoglykämischen Wirkung der Gallensäure. 463.

Tissue, The redox-potential of the living —. 69.

TOSHIMA, Katsuo. A cold-hemotoxin, newly discovered in the heated serum. Part IV. The cold, non-complementary hemolysis by the heated serum of cold-blooded animals. 1.

Part V. The cold, non-complementary hemolysis by the heated body-fluids. 9.

U

Ultraviolet, Über den Einfluss der Bakterien und der — und Röntgenstrahlen auf Gallensäuren. 489.

URAKI, Ziro. Bedeutung der Gallensäure im Kohlenhydratstoffwechsel. XI. Über den Einfluss der Gallensäure auf die Synthese und Spaltung der Hexosephosphorsäure in der Leber, der Niere und im Muskel. 123.

Urikase, Über die —. 361.

Urine, Studies on the excretion of neutral sulphur and oxyproteic acid in — under several different conditions. 265.

Urine, The determination of oxyproteic acid in —. 257.

V

Vitamin C, Glutathione content of organ tissues of guinea pigs fed on — free diet. 325.

Y

YANAGI, Kintaro. Ein Beitrag zum Studium der Eigenschaften des Plasmaeiweisses vom Quergestreiften Muskel. 305.

YOSHIMURA, Katsuji, TADOKORO, Tetsutaro and ABE, Makoto. On the physico-chemical differences between α -, β - and γ -hemoglobins. 145.
